

UNIVERSITE DE GENEVE

FACULTE DES SCIENCES

Département de biochimie

Professeur J.P.Bargetzi

"GLUTAMATE DESHYDROGENASE DU CORTEX CEREBRAL DE BOEUF,
PURIFICATION, STRUCTURE QUATERNAIRE ET MECANISMES CATALYTIQUES"

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur es sciences biochimiques

par

Bernard SCHWENDIMANN

de

Niederstocken (Berne)

THESE No 1639

1974

GENEVE

Imprimerie de la Section de Physique

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545931_0050

UNIVERSITE DE GENEVE

FACULTE DES SCIENCES

Département de biochimie

Professeur J.P.Bargetzi

"GLUTAMATE DESHYDROGENASE DU CORTEX CEREBRAL DE BOEUF,
PURIFICATION, STRUCTURE QUATERNAIRE ET MECANISMES CATALYTIQUES"

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur es sciences biochimiques

par

Bernard SCHWENDIMANN

de

Niederstocken (Berne)

THESE No 1639

GENEVE

Imprimerie de la Section de Physique

1977

La faculté des sciences, sur le préavis du professeur J.P. BARGETZI, directeur de thèse, et d'une commission composée des professeurs J. DESHUSSES (Faculté des sciences) et G. SEMENZA (Ecole polytechnique fédérale de Zurich) autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 31 janvier 1974

Le Doyen :

Jean MULLER

Thèse No. 1639



REMERCIEMENTS

Qu'il me soit permis de remercier tous ceux qui m'ont encouragé et conseillé tout au long de mon travail. Ma gratitude s'adresse en premier lieu au professeur Bargetzi, à qui je dois ma formation de Biochimiste, pour son appui constant ainsi qu'au regretté professeur Rouiller, qui par l'entremise de ses collaborateurs L. Orci et A. Perrelet, m'a permis de m'initier aux techniques de microscopie électronique. Il ne m'est pas possible de citer ici tous ceux qui lors de fructueuses discussions m'ont conseillé et fait profiter de leurs connaissances techniques. Je pense en particulier à mes collègues de laboratoire et parmi eux Jacqueline Pache-Pfister, qui a contribué pour une large part à la mise au point de la méthode de purification de la GDH, et messieurs D.A. Baer, H.M. Eppenberg et R. Wenger, qui m'ont fait partager leur expérience à mes débuts. Enfin, ma reconnaissance va au FNRS pour l'aide qu'il m'a généreusement accordée. (Crédits FNRS 3.180.69, 3.426.70 et 3.778.72)

TABLE DES MATIERES

I. Préambule	1
Abréviations	6
Matériel	8
II. Méthodes d'isolement et de purification	9
II.1. Purification des réactifs	9
1. Sodium dodecyl-sulfate	9
2. Acrylamide	9
3. N,N'-méthylène-bis-acrylamide = BIS	9
II.2. Extraction et purification de la GDH	10
1. Préparation de mitochondries de cortex cérébral	10
2. Préparation de poudre acétonique de cortex cérébral	10
3. Extraction à partir des mitochondries	11
4. Extraction à partir de poudre acétonique	12
5. Purification de la GDH	12
II.3. Méthodes analytiques	13
1. Test standard d'activité enzymatique de la GDH	13
2. Précipitation au sulfate d'ammonium	14
3. Electrophorèse sur gel d'agarose	14
4. Electrophorèse sur gel d'acrylamide	15
5. Electrophorèse sur gel d'acrylamide à concentration variable	17
6. Electrophorèse sur gel d'acrylamide à concentration variable, en présence d'urée	18
7. Electrophorèse sur gel d'acrylamide-SDS	18
8. Vitesse de sédimentation	20
9. Isoelectrofocusing	21
10. Filtration sur gel : " gel sieving "	22
11. Microscopie électronique	23
12. Résistance thermique de la GDH	24
13. Maléylation de la GDH de cerveau	24

II.4 Résultats et discussion	25
1. Résultats	25
2. Discussion	41
III. Propriétés catalytiques de la GDH de cerveau	44
III.1 Détermination de l'activité de la GDH	44
1. Effet du pH sur la réaction : pH optimum	45
2. Spécificité à l'égard des acides aminés	46
3. Cinétique du steady state	47
1. Réaction en présence d'un large excès de NAD ⁺ par rapport à la GDH	47
2. Détermination des paramètres cinétiques	47
3. Inhibition par l'acide D-glutamique	48
4. Réaction en présence d'AMP	49
5. Réaction en présence de GTP	49
6. Réaction en présence de Sérotonine	49
III.2 Résultats	50
1. Spécificité de la glutamate deshydrogénase de cerveau de boeuf	50
2. Cinétique du steady state	56
3. Cinétique enzymatique : théorie générale	63
4. Discussion	68
1. Mécanisme réactionnel	68
2. Inhibition par excès de substrat	79
3. Activation par NAD	80
Discussion	87
4. Inhibition par l'acide D-glutamique	89
5. Activation par les AMP	95
6. Action de GTP	100
7. Effet de la sérotonine	101
Appendice	103
IV. Conclusions	112
Bibliographie	120

Résumé

Un procédé de purification de la glutamate deshydrogénase (EC.1.4.1.3) de cerveau de boeuf est proposé, aboutissant à la cristallisation de l'enzyme. Deux voies de préparation sont empruntées, l'une passant par l'isolement préalable des mitochondries, l'autre par la fabrication d'une poudre acétonique du cortex cérébral. Le point isoélectrique de 4.92 est déterminé par isoelectrofocusing. Les poids moléculaires de 57 000 daltons pour le protomère et 340 000 pour l'unité active ou hexamère sont déterminés par filtration sur gel, ultracentrifugation analytique et électrophorèse sur gels polyacrylamide-SDS. Le coefficient de sédimentation $S_{20,w} = 11.64$ svedberg est attribué à l'unité active. L'observation au microscope électronique de l'enzyme indique qu'il possède une géométrie ponctuelle C_{32} de l'arrangement des sous-unités dans l'hexamère. Deux types de liaisons inter-protomères sont impliqués dans une telle configuration : entre éléments situés dans un même plan d'une part, et entre éléments appartenant à deux plans superposés, d'autre part.

Du point de vue catalytique, un couplage des sous-unités deux-à-deux est démontré par l'effet d'activation de la réaction de déamination par NAD à des concentrations supérieures à 10 μ M. Les constantes cinétiques suivantes sont déterminées sur l'enzyme cristallisé : Constantes de Michaelis, $K_M^{L-Glu} = 6.5 \times 10^{-3}$ M ; $K_{M1}^{NAD} = 5.0 \times 10^{-6}$ M ; $K_{M2}^{NAD} = 2.4 \times 10^{-5}$ M ; vitesse maximale = 9.18×10^{-6} mole/min pour une concentration en GDH de 20 μ g/ml ; "turnover number" = 26 . Une inhibition compétitive hyperbolique est observée en présence de l'isomère optique dextrogyre du substrat : D-Glu.

Les mononucléotides 2'-3'AMP et 5'AMP montrent un effet activateur à des concentrations inférieures à 2 mM alors qu'en dessus de 10 mM un effet inhibiteur devient prédominant.

L'étude de l'activité en fonction du pH met en évidence l'importance des groupes ionisés de L-Glutamate dans la formation du complexe enzyme-substrat. Plus particulièrement la charge positive sur le groupe α -amino se révèle indispensable à la fixation alors que la forme chimiquement réactive est non protonée. Le pH optimal est de 7.8 dans la réaction directe et se situe entre pH 8.5 et 9.0 dans la réaction inverse.

I. Préambule

La glutamate deshydrogénase est un enzyme répandu dans tout le monde vivant, du règne végétal au règne animal, ce qui lui assigne une fonction importante dans le métabolisme. Le tableau ci-dessous rappelle les principales préparations de GDH publiées à ce jour.

Origine de la préparation	Auteurs
Thiobacillus novellus	Lejohn ⁸⁸ , Lejohn & McCrea ⁹⁰
Blastocladiella emersonii	Lejohn & Jackson ⁸⁹
Fusarium spec.	Sanwal ¹¹⁵
Neurospora crassa	Barrat & Strickland ⁵
Saccharomyces cerevisiae	Fourcade ⁴⁹
Roussette (sélacien) foie	Corman et al. ²⁵
Poulet : foie	Snoke ¹²³
Rat : foie	Arnold & Maier ⁴ , Sedgwick & Frieden ¹¹⁹
Boeuf : foie	Olson & Anfinsen ¹⁰⁴ *)
Boeuf : cerveau	Erwin ⁴³ , Grisolia et al. ⁶²
Homme : foie	Kubo et al. ⁷⁹ , Lehman ⁸⁶
Homme : cellules Chang du foie	di Prisco & Strecker ³¹

*) Ces auteurs cristallisèrent pour la première fois GDH

Les GDH de diverses provenances se distinguent les unes des autres par leur spécificité à l'égard du coenzyme, pyridine nucléotide, qui peut être soit NAD^+ -NADH, soit NAD^+P -NADPH. La commission internationale de nomenclature reconnaît :

GDH NAD spécifique, EC.1.4.1.2 que l'on rencontre essentiellement chez les bactéries ^{115 124 126 127}

GDH NAD(P) aspécifique, EC.1.4.1.3 propre au règne animal

GDH NADP spécifique, EC.1.4.1.4 qui est connu chez les bactéries et les champignons inférieurs ^{115 140}.

Les trois enzymes sont réunis sous le nom systématique de L-glutamate: $\text{NAD}^+(\text{P})$ oxydoréductase (déaminative), nom traduisant la catalyse de la réaction :



Cette réaction banale a cependant retenu l'attention des neurophysiologistes ¹¹⁸ qui y voient un moyen de détoxication de l'ammoniaque libéré dans le système nerveux parallèlement à la formation de glutamate à partir de 2-oxoglutarate, processus qui se poursuit par la fixation d'une seconde molécule d'ammoniaque et formation de glutamine sous l'action de la glutamine synthétase EC.6.3.1.2 . Il convient de réécrire l'équation I.1) :



La seconde fonction attribuée à GDH, apport d'énergie au cycle tricarboxylique par formation de 2-oxoglutarate, soulève un problème de thermodynamique. Burton & Krebs ¹³ calculent l'énergie libre de la réaction à 25° et dans des conditions standard de concentration des réactants : $\Delta G = +18.26 \text{ Kcal/mole}$ pour la réaction



C'est la valeur d'énergie libre la plus élevée, parmi celle des 24 réactions du cycle tricarboxylique et réaction associées étudiées par ces auteurs. La constante d'équilibre correspondante de $4.0 \cdot 10^{-14} \text{ M}^2$, est en accord avec la valeur obtenue par mesure directe $1.45 \cdot 10^{-13} \text{ M}^2$ ¹⁰⁵, compte tenu des facteurs de normalisation des activités des réactants. Ces

valeurs montrent un équilibre très en faveur de L-glutamate, ce qui nous conduit à adopter la nomenclature suivante :

réaction directe définie par l'équation I.2)

réaction inverse définie par l'équation I.1)

expressions que nous utiliserons par la suite sans autre spécification.

Du point de vue thermodynamique, la fixation de l'ammoniaque (dans le sens direct de la réaction) est parfaitement spontanée et sans aucun doute conduit, en l'absence d'un autre mécanisme, à l'accumulation de glutamate. Or, un taux élevé en glutamate est tout aussi préjudiciable au fonctionnement du neurone, qu'un excès d'ammoniaque. Il doit donc exister un système régulateur dans lequel GDH est impliqué.

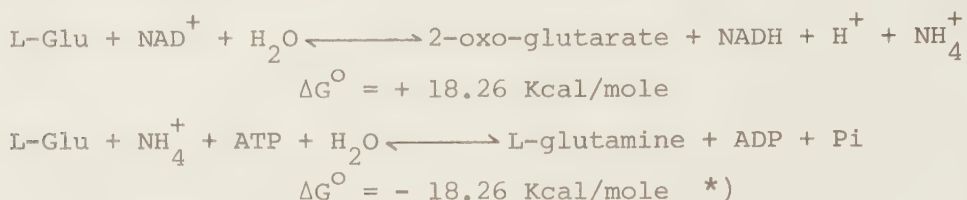
Des désordres convulsifs (seizures) ont été attribués sans ambiguïté à une surcharge en glutamate au niveau du cortex ^{9 12}, faisant suite à une modification de la perméabilité des membranes neuronales, particulièrement au niveau des dendrites et du corps cellulaire ^{98 132}. L'une des fonctions du glutamate est la neutralisation des cations potassium, effet essentiellement statique qui impose un taux relativement élevé en glutamate. C'est ce que l'on peut constater dans le tableau I : l'acide glutamique et la glutamine représentent à eux deux près de la moitié de l'azote libre * dans le cerveau. Fourni en excès à des tranches de cerveau de rat, le glutamate est converti en aspartate et en glutamine⁸, alors qu'un excès d'aspartate est transformé en glutamate et en glutamine. Ces trois acides aminés, Asp, Glu et Gln, forment les pôles d'un système régulateur impliquant au minimum 4 enzymes :

GDH (EC.1.4.1.3), la glutamine synthétase (EC.6.3.1.2), la glutamate-oxaloacétate-transaminase (EC.2.6.1.1) et la glutamate-cétoacide-transaminase (EC.2.6.4.13).

L'action en sens inverse de GDH ne peut être considérée isolément, puisqu'elle se solde par la libération d'ammoniaque;

* Azote des amines biogènes, acides aminés et autres métabolites.

tant du point de vue thermodynamique que du point de vue métabolique, il est nécessaire d'y associer une réaction qui élimine autant que possible l'ammoniaque et fournisse l'énergie nécessaire. Ce pourrait être l'amination d'une molécule de glutamate en glutamine sous l'effet de la glutamine synthétase, alors qu'une autre molécule de glutamate serait oxydée en céto-acide :



Il y a deux obstacles à un tel couplage. Tout d'abord, la GDH et la glutamine synthétase appartiennent à deux compartiments métaboliques distincts, la mitochondrie et le cytoplasme respectivement, ce qui interdit l'échange direct des substrats et produits. D'autre part, le transfert de l'énergie d'une réaction à l'autre ne se conçoit pas ici sans l'intervention d'un système "magique" inacceptable. La régulation du taux de glutamate libre doit donc se faire suivant un jeu plus complexe de réactions, dans lequel vraisemblablement la GDH fonctionne que dans le sens direct.

Il apparaît pourtant que GDH joue un rôle important et spécifique dans le métabolisme du cerveau. Cela justifie-t-il l'existence d'un isoenzyme dans le système nerveux ? Si GDH de cerveau est bien un isoenzyme de celui du foie, possède-t-il des propriétés catalytiques foncièrement différentes ? Autant de questions auxquelles nous nous efforçons de répondre ici, dans la mesure de nos moyens. Nous sommes parfaitement conscients que dans notre démarche nous isolons artificiellement une réaction enzymatique parmi de nombreuses autres

*) L'énergie libre de la réaction catalysée par la glutamine synthétase a été calculée à partir des énergies libres de formation tirées de Burton & Krebs¹³.

réactions vraisemblablement organisées en systèmes multi-enzymes, sous des formes voisines des complexes enzymatiques déjà connus tels ceux de la DNA polymérase et de certains enzymes du cycle tricarboxylique. Dans de tels systèmes, les substrats sont transférés d'un enzyme à l'autre sans se trouver à aucun moment à l'état libre au sens strict du terme. Ceci affaiblit naturellement toute argumentation reposant sur l'effet des concentrations de molécules libres. Cela est d'autant plus vrai que GDH est essentiellement localisée dans les mitochondries, organelles qui forment par essence un système structuré d'enzymes à fonctions enchaînées et complémentaires.

TABLEAU I

Acides aminés libres dans le cerveau ⁹⁸.

ACIDE AMINE	µmole par 100g de tissu frais cerveau de chien	rapport cerveau/plasma sanguin
Ala	14	2.5
acide γ-aminobutyrique	83	300
Arg	69	1
Asp	245	300
N-acétyl-Asp	974	-
Glu	781	150
Gln	560	10
Gly	55	5
Leu	9	0.7
Thr	29	2

Abréviations

Par souci de concision, les abréviations suivantes ont été adoptées dans le texte, dont certaines sont déjà passées dans l'usage courant, mais qu'il est bon de préciser ici.

GDH	L-glutamate: NAD(P) oxydoréductase (déaminative) de son nom trivial glutamate deshydrogénase.
NAD^+/NADH	nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée/ forme réduite.
$\text{NADP}^+/\text{NADPH}$	nicotinamide adénine dinucléotide 2-phosphate, forme oxydée/forme réduite.
L-Glu	acide glutamique isomère L
D-Glu	acide glutamique isomère D
G-150 et G-200	gel poreux de dextrane polymérisé en particules sphériques, utilisé en filtration sur gel. La limite d'exclusion de ces gels est donnée grossièrement par le nombre placé à droite du signe G, en milliers de Daltons.
Sephadex A-50	résine de dextrane polymérisée en particules sphériques et substituée par un groupe diéthyl-amino-éthyle (pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Suède). C'est l'équivalent des celluloses substituées, auxquelles on les préfère lorsqu'une grande capacité est requise. A-50 spécifie respectivement la substitution et le degré de réticulation du gel.
Sepharose 4B et 6B	marque déposée de gels d'agarose en particules sphériques produites par la firme Pharmacia, et utilisés au même usage que les Sephadex de la série G- . Le type 4B a une limite d'exclusion de $20 \cdot 10^6$, le type 6B, de $4 \cdot 10^6$.

K_{eq}	constante d'équilibre thermodynamique
K_m	constante de Michaelis
V_{max}	vitesse maximale définie par l'expression de Michaelis-Menten.
BIS	N,N'-méthylène-bis-acrylamide. Produit responsable de la réticulation des gels de polyacrylamide.
Tampon	Sous cette dénomination, il faut comprendre
Phosphate	phosphate de potassium, sauf indication contraire.

Matériel

La sédimentation des mitochondries est réalisée soit dans une centrifugeuse réfrigérée MSE équipée d'un rotor "angle head" de 8 x 40 ml de capacité, soit dans une Spinco modèle L avec rotor 19 ou rotor 50, ou encore une Sorval RC2B et le rotor SS-34.

Les homogénéisations de tissus frais ont été faites à l'aide de l'Omnimixer de Sorval, alors que la désintégration des mitochondries est réalisée à l'aide d'un appareil à ultrasons de Branson Co. (USA) "Branson sonifier" de 100 W (à 10 KHz).

Les observations au microscope électronique sont faites sur un microscope JEOL Co. (Japon) modèle JEM T7.

Dans les opérations nécessitant un travail à basse température, le refroidissement des solutions se fait à l'aide d'un plongeur réfrigérant Colora TK 64.

Sauf contre-indication dans le texte, les produits chimiques utilisés sont fournis par la maison Fluka (Buchs, Suisse) dans la qualité chromatographiquement purs, CHR.

Les phosphates mono- et dipotassiques servant à la préparation des tampons sont des produits Merck (Darmstadt, Allemagne) de qualité puriss pour analyse.

II. Méthodes d'isolement et de purification

II.1. Purification des réactifs

II.1.1. Purification du sodium dodecylsulfate (SDS)

La méthode utilisée est celle décrite par Dregger et al.³⁴. 100 g de SDS (Fluka, pract.) ont été mis en solution dans 1 litre d'eau distillée, puis filtrés afin d'éliminer les produits insolubles. Le pH a été ajusté à 7.0, puis la solution extraite par deux fois 200 ml d'éther, les produits non sulfonés étant ainsi éliminés.

La solution a ensuite été concentrée à l'évaporateur rotatif, sous vide et à 40°C. Le SDS purifié a été cristallisé par refroidissement de la solution concentrée.

II.1.2 Purification de l'acrylamide

La méthode utilisée est celle décrite par U.E. Loening⁹³. L'acrylamide (Fluka, purum) a été mis en solution dans du benzène chaud (70°C), filtré à chaud puis refroidi lentement jusqu'à 0°C. Les cristaux ont été abondamment lavés avec de l'heptane, puis séchés sous vide pour éliminer les traces de solvant organique.

II.1.3. Purification du N,N'-méthylène-bis-acrylamide (BIS)

La méthode utilisée a été également décrite par U.E. Loening⁹³. Le BIS (Fluka, pract.) a été dissout dans de l'eau distillée chaude (80-90°C) puis la solution a été décolorée par du charbon actif et filtrée.

Le BIS a été cristallisé par refroidissement de la solution, les cristaux lavés avec de l'eau à 0-4°C, puis séchés sous vide.

II.2. Extraction et purification de la GDH

II.2.1. Préparation de mitochondries de cortex cérébral

La technique qui a été utilisée est inspirée, pour l'essentiel des travaux de Schneider¹¹⁶, de Leighton et al.⁸⁷, de Stahl et al.¹²⁵, et de Gray⁶¹.

Le cortex a été débarrassé de la matière blanche, puis homogénéisé dans du sucrose 0.25 M, dans les proportions de 50 g de cortex pour 100 ml de solvant (Omnimixer Sorvall, 5 fois 30 secondes à vitesse maximale), puis le pH a été ajusté à 7.5 à l'aide d'ammoniaque concentrée.

L'homogénat a été centrifugé à 600 x g pendant 10 min. à 4°C (Centrifugeuse MSE, rotor "angle head" 8 x 50 ml). Le précipité a été à nouveau homogénéisé dans le mixer, avec le même volume de sucrose 0.25 M qu'à la première opération, et la centrifugation répétée dans les mêmes conditions.

Les deux surnageants ont été réunis et centrifugés à 8 500 x g pendant 10 min. à 4°C.

Le culot obtenu alors a été mis en suspension dans le même volume de sucrose 0.25 M qu'initialement, et de nouveau centrifugé à 8 500 x g pendant 10 min. à 4°C.

Le culot résultant a été mis en suspension dans une solution isotonique de chlorure de potassium, et la centrifugation répétée dans les mêmes conditions. Les mitochondries formant le culot ont été enfin mises en suspension dans du tampon phosphate 0.2 M pH 7.5, puis congelées à -18°C pendant 72 h avant l'extraction.

II.2.2. Préparation de la poudre acétonique de cortex cérébral

Le cortex de dix cerveaux a été isolé (poids frais : 400 à 450 g par cerveau), environ 2500 g de cortex ont été obtenus, Cette masse a été homogénéisée dans 4 à 5 litres d'acétone refroidie à -20°C (Omnimixer Sorvall, 5 fois 30 secondes à vitesse maximale). Le volume de l'homogénat a été complété à 15 litres avec de l'acétone à -20°C, et maintenu à cette température sous agitation constante pendant une nuit.

Cette suspension a été filtrée (papier Schleicher et Schuell LS 14) dans un Büchner de 30 cm de diamètre. (La toile de fromager convient aussi à cette opération). Le cake obtenu a été suspendu dans 10 litres de n-butanol à -20°C et agité pendant 4 h à cette température. La suspension a été filtrée comme ci-dessus, après avoir ajouté 5 litres d'acétone à -20°C pour faciliter la filtration.

Le cake a été lavé sur le Büchner avec de l'acétone à -20°C , puis avec de l'éther éthylique.

Le cake a été pulvérisé grossièrement, et séché sous léger courant d'air dans une chapelle.

Cette procédure a permis d'obtenir 300 à 350 g de poudre acétonique blanche-écruée, légère et farineuse, par opération.

II.2.3. Extraction à partir des mitochondries

Les mitochondries congelées pendant au moins 72 h (cf. II.2.1.) ont été dégelées et soumises à une sonication de 10 min., la suspension étant maintenue froide pendant l'opération. En 10 min., toute la GDH contenue dans les mitochondries a été libérée. Les fragments de mitochondries ont été éliminés par centrifugation à $27\,000 \times g$ pendant 60 min. (Centrifugeuse Sorvall RC2 B, rotor SS-34).

Le surnageant contenant les protéines solubles a été dialysé contre 15 volumes de tampon phosphate 0.05 M pH 7.5 pendant une nuit.

Le dialysat a été ensuite adsorbé en batch par du Sephadex A-50 (DEAE) équilibré dans le tampon de dialyse. (200 ml de gel par g de protéines). Le gel a été ensuite transféré dans une colonne à chromatographie (4 cm de diamètre, 90 cm de haut). Le gel a été lavé avec le tampon de dialyse (60 ml/h), jusqu'à ce que l'absorbance de l'effluent soit inférieure à 0,1 DO. Les protéines ont été alors éluées avec le tampon additionné de KCl 0.15 M, et recueillies en fractions de 5 à 10 ml. Le pool des fractions actives en GDH a représenté environ 400 ml par opération.

II.2.4. Extraction à partir de poudre acétonique

100 g de poudre acétonique ont été mis en suspension dans 1 200 ml d'eau distillée et agités pendant une nuit à 4°C. Le matériel insoluble a été éliminé par centrifugation à 5860 x g (Centrifugeuse Sorvall RC2 B, rotor GSA). Le surnageant a été dialysé pendant 24 h à 0-4°C contre 15 volumes de tampon phosphate de potassium 0.05 M pH 7.5, avec un changement de tampon de dialyse après 6 h.

Les protéines ont été ensuite adsorbées en batch par du Sephadex A-50 équilibré dans le même tampon. Le lavage et l'élution ont été effectués dans les mêmes conditions que précédemment (cf. II.2.3.). Le volume contenant la GDH a également été de 400 ml.

II.2.5. Purification de la GDH

Le procédé de purification décrit ci-dessous a été utilisé aussi bien sur l'extrait brut obtenu à partir de mitochondries que de poudre acétonique.

L'extrait brut contenant la GDH (environ 400 ml) a été additionné de 22% de sulfate de sodium et laissé à température ordinaire pendant une nuit. Le précipité formé a été recueilli et redissout dans 100 ml de tampon phosphate 0.05 M pH 7.5. Cette solution a été refroidie à 0-4°C et amenée à 45 % de saturation en sulfate d'ammonium³³, et laissée pendant 2 h à la même température. Le précipité contenant la GDH a été récupéré, puis redissout dans un minimum de tampon (30-50 ml) et appliqué par fractions de 30 ml sur un système de deux colonnes successives de Sephadex, G-150 et G-200 respectivement, équilibrées par un tampon phosphate 0.1 M pH 7.5.

Un résultat comparable a été obtenu en utilisant du Sepharose 4B ou 6B en lieu et place du Sephadex G-200, et ce avec l'avantage d'un flux plus élevé et plus régulier.

L'activité GDH est apparue au début du pic des protéines. Les fractions actives ont été réunies (volume : 400 ml) et en gar-

dant la solution à 0-4°C, amenée à 40% de saturation en sulfate d'ammonium. Le précipité obtenu a été ensuite repris dans du tampon phosphate 0.05 M pH 7.5, concentration finale en protéine : 20 - 30 mg/ml.

Du sulfate d'ammonium solide a été progressivement ajouté à cette solution jusqu'à l'apparition d'un léger trouble, soit environ 20 % de saturation. L'adjonction de sulfate d'ammonium a été cessée, et après plusieurs jours à 0-4°C, la GDH a cristallisé en fines paillettes de 10^{-3} à 10^{-2} mm de large et de 0.1 à 1 mm de long.

II.3. Méthodes analytiques

II.3.1. Test standard de l'activité enzymatique de la GDH

Matériel :

Tampon : phosphate de potassium 0.2 M pH 7.7

Substrats : solution stock de L-Glutamate de sodium (Sigma, grade 99-100%) 1/3 M dans le tampon.

NAD⁺ (Merck, pour usages biochimiques), solution stock à 1 mg/ml dans le tampon.

Méthode : Dans une cuvette de spectrophotomètre de 3 ml de contenance et de 1 cm de chemin optique, les réactifs suivants ont été mélangés :

0.1 ml de la solution stock de L-Glu

0.1 ml de solution stock de NAD⁺

2.7 ml de tampon

Au temps zéro, 0,1 ml de solution d'enzyme a été introduit dans le mélange, et la variation moyenne d'absorbance à 340 nm a été mesurée entre le temps $t = 1$ min. et le temps $t = 5$ min. selon la relation :

$$\Delta A = \frac{A_{5'} - A_{1'}}{4'} \quad \text{unités d'absorbance par minute.}$$

Une relation entre la concentration de l'enzyme et ΔA a été établie en utilisant de la GDH de foie (Boehringer, pour

usages analytiques, suspension de cristaux dans une solution de sulfate d'ammonium 2.0 M), dans des concentrations de 0 à 3 µg/ml, domaine de concentrations dans lequel la relation est linéaire.

II.3.2. Précipitations au sulfate d'ammonium

Les précipitations au sulfate d'ammonium ont été faites selon Dixon³³ : le sel solide, pulvérisé au mortier, a été ajouté très progressivement, en maintenant la température de la solution à 0-4°C, jusqu'au taux de saturation désiré.

II.3.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

Matériel : Agarose REO (Behringer)

Tampon véronal 0.03 M pH 8.6

Tampon phosphate 0.05 M pH 8.5

Acide L-Glutamique 1 M

NAD⁺

PMS : phénazine méthosulfate (Calbiochem) 5 mg/ml

NBT : nitroblue tetrazolium (Calbiochem) 10 mg/ml

Amidoblack 1% dans de l'acide acétique 7%

Méthodes

Gel d'électrophorèse : 300 mg d'agarose ont été dissouts dans 30 ml de tampon véronal, en chauffant sous agitation. Après dissolution complète de l'agarose, la solution a été refroidie jusqu'à 40°C, puis versée sur le support (plaque de verre photographique 8.5 cm x 10 cm). Le gel a été mis à durcir à 0-4°C.

Gel d'activité : 150 mg d'agarose ont été dissouts dans 21.2 ml de tampon phosphate par chauffage. A cette solution refroidie à 40°C, 2 ml d'acide L-Glutamique 1 M y ont été ajoutés, puis 10 mg de NAD⁺, 0.05 ml de PMS et 0.5 ml de NBT. Ce mélange a ensuite été versé sur la plaque support, et le gel a été mis à durcir à l'abri de la lumière²⁵.

Electrophorèse : l'échantillon a été appliqué dans une fente (1 x 5 mm) ou dans un trou (3 mm ø) creusé à 3 cm du bord droit du gel. Ce dernier a été mis en contact avec les bacs

à électrophorèse contenant le tampon par un pont de papier filtre, anode à droite et cathode à gauche. Un courant de 40 mA (environ 150 V) a été appliqué et maintenu tout au long de l'électrophorèse, soit environ 90 min.

Coloration spécifique de l'activité de la GDH

Le gel d'activité a été déposé sur le gel d'électrophorèse, en évitant toute bulle d'air à l'interface. Le tout a été laissé 30 min, à l'abri de la lumière. A l'endroit où se produit la réduction du NAD^+ est apparu un formazan au dépend du PMS et du NBT, de couleur bleue-violette. Le gel d'activité a été fixé dans de l'acide acétique à 7%.

Le gel d'électrophorèse a été fixé dans les mêmes conditions pendant 45 min., puis les deux gels ont été séchés à l'air sur leurs plaques de verre. Le gel d'électrophorèse a été fixé à l'Amidoblack pendant 10 min., puis décoloré dans de l'acide acétique 7%.

II.3.4. Electrophorèse sur gel d'acrylamide

Matériel : les solutions stock suivantes ont été préparées :

- A : 48 ml HCl 1 M
36.3 g TRIS (tris-hydroxy-aminométhane)
0.46 ml TEMED (tétraméthyl-éthylène-diamine)
complété à 100 ml par de l'eau distillée
pH final : 8.9
- B : 6.4 ml H_3PO_4 1 M
1.425 g TRIS
complété à 100 ml par de l'eau distillée
pH final : 6.9
- C : 45 g d'acrylamide recristallisé
1.2 g de BIS
complété à 100 ml par de l'eau distillée
- D : 10 g d'acrylamide recristallisé
2.5 g de BIS recristallisé
complété à 100 ml par de l'eau distillée

AP : 14 mg de persulfate d'ammonium
 10 ml d'eau (cette solution a été préparée
 juste avant l'emploi)

Tampon des réservoirs : 12 g de TRIS
 57.6 g de Glycine
 complété à 1 litre par de l'eau
 distillée. pH final : 8.3

Méthodes

Préparation des tubes

Les tubes de verre (4 mm ϕ int. x 70 mm) ont été trempés une nuit dans de l'acide sulfurique concentré, puis rincés à l'eau distillée, et ensuite trempés 30 secondes dans une solution de diméthyl-dichlorosilane à 2%, et enfin séchés à l'étuve.

Préparation des gels

Gel à pores étroits :	solution A	1 volume
	solution C	1.3
	eau distillée	1.7
	solution AP	4

Le mélange a ensuite été dégazé, puis versé dans les tubes préalablement obturés à l'une de leur extrémité par du parafilm, jusqu'à atteindre une hauteur de 50 mm. Le gel a été alors recouvert de 3 mm d'eau, et laissé polymériser à température ambiante pendant 30 min.

Gel à pores larges :	solution D	1 volume
	solution B	1
	eau distillée	1
	solution AP	1
	TEMED	1.5 μ l/ml

Les gels à pores étroits, polymérisés dans les tubes, ont été recouverts par 5 mm de gel à pores larges, et à nouveau laissés 30 min. à température ambiante.

Le tampon des électrodes a été préparé en diluant 10 fois le tampon stock.

Electrophorèse

Une fois les tubes placés dans l'appareil à électrophorèse, et les réservoirs remplis de tampon, les échantillons, dissouts dans le tampon contenant 10% de glycérine, ont été déposés à la surface des gels. Un courant constant de 3 mA par tube a été appliqué pendant 90 min. environ.

Les gels ont ensuite été retirés des tubes et colorés dans une solution d'Amidoblack 1% dans de l'acide acétique 7%, puis décolorés par immersion dans un mélange méthanol-acide acétique-eau (2.5 - 7.5 - 90).

Localisation de l'activité GDH

Le mélange suivant a été préparé :

Tampon phosphate 0.1 M, pH 8.0	10	ml
Glutamate de potassium 1 M	2	ml
NAD ⁺	10	mg
PMS (cf. II.3.3)	0.05	ml
NBT	0.5	ml

Les gels(non fixés) ont été immergés dans cette solution pendant 30 min. à l'obscurité, et la GDH a été localisée par la formation d'une collerette violacée à son emplacement.

II.3.5. Electrophorèse sur gel d'acrylamide de concentration variable

Hedrick et Smith⁶⁴ ont proposé cette méthode pour la détermination du poids moléculaire des protéines en évitant leur dénaturation. La préparation des gels a été la même que celle décrite sous II.3.4., à l'exception de la concentration finale en acrylamide pour les gels à pores étroits, qui a varié entre 5 et 15%. Pour chaque concentration, le même rapport entre la quantité de BIS et d'acrylamide a été maintenu, afin d'obtenir chaque fois le même taux de réticulation. D'autre part, le gel à larges pores a été supprimé.

Les conditions d'électrophorèse, de fixation et de coloration ont été identiques à celles décrites sous II.3.4.

Estimation du poids moléculaire

La mobilité μ d'une série de protéines de référence et de la GDH a été déterminée de la manière suivante : avant la fixation et la coloration du gel, sa longueur L_0 a été mesurée, ainsi que la distance de migration D_B du bleu de bromphénol.

Le gel a ensuite été fixé, coloré et décoloré selon le processus habituel, et sa longueur L_1 mesurée, de même que la distance de migration de la protéine D_P .

La mobilité a été alors déterminée par la relation :

$$\mu = \frac{D_P}{L_1} \times \frac{L_0}{D_B}$$

Le logarithme de la mobilité a été ensuite reporté graphiquement en fonction de la concentration d'acrylamide dans le gel, ce qui a permis d'obtenir, pour chaque protéine, une droite dont la pente est proportionnelle à son poids moléculaire.

II.3.6 Electrophorèse sur gel d'acrylamide de concentration variable, en présence d'urée

La même méthode de préparation des gels que celle décrite sous II.3.5 a été utilisée, sauf que les gels et le tampon des électrodes contenaient la concentration adéquate d'urée (qualité puriss., désionisée.)

II.3.7 Electrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de SDS

Matériel :

Tampon d'incubation : Phosphate de sodium 0.05 M, pH 7.0
contenant 1% de SDS et 1% de β -mercapto-
éthanol.

Tampon des gels : Phosphate de sodium 0.05 M, pH 7.0
contenant 0.2% de SDS.

Solution stock

```
d'acrylamide_(10%) : Acrylamide recristallisé 22.2 g
                    BIS recristallisé          0.6 g
                    eau distillée à           100 ml
```

La solution a été filtrée et conservée dans un flacon brun.

Bleu de bromphénol : 0.05 % dans l'eau.

<u>Colorant</u> :	Coomasie brilliant blue	
	R-250 (purum, Serva)	1.25g
	Méthanol 50 %	454 ml
	Acide acétique glacial	46 ml

La solution a été filtrée sur papier Whatman n° 1.

<u>Décolorant</u> :	Acide acétique glacial	75 ml
	Méthanol 50 %	50 ml
	Eau distillée	875 ml

Méthodes :

Les tubes ont été préparés comme sous II.3.4

<u>Préparation_des_gels</u> :	Solution stock d'acrylamide	13,5	ml
	Tampon pour gels	3	ml
	Eau distillée	12	ml
	TEMED	0.045	ml
	Persulfate (15 mg/ml)	1.5	ml

La solution a été dégazée, les tubes remplis et laissés à température ambiante. (Hauteur des gels : 10 cm).

Tampon des électrodes :Le tampon des gels a été dilué 5 fois.

Electrophorèse : La migration a été effectuée, en appliquant un courant constant de 6 mA par tube, jusqu'à ce que le bleu de bromphénol soit à 1.5 cm de l'extrémité inférieure des tubes.

Coloration : Les gels ont été laissés 2 h. dans le colorant.

Décoloration : Les gels ont été placés dans le décolorant et chauffés à 40°C dans un bain-marie pendant 2 h., avec de fréquents changements de la solution.

Estimation du poids moléculaire

La détermination de la mobilité μ de la GDH, ainsi que des protéines de référence a été faite selon la méthode décrite sous II.3.5, puis un graphe a été établi en reportant la mobilité en fonction du logarithme du poids moléculaire des protéines de référence. Une droite a alors été définie, à partir de laquelle le poids moléculaire de la GDH a été estimé.

II.3.8 Vitesse de sédimentation

Matériel :

Centrifugeuse analytique Spinco Model E (Beckman), Rotor type AN-D, cellule double secteur à colonne de 15 mm.

Microcomparateur Nikkon.

Densimètre digital DMA 02C selon Kratky (A. Paar)

Tampon phosphate de sodium 0.05 M, pH 7.5 contenant 5% de glycérine, la GDH a été dialysée une nuit contre ce tampon, le tampon de dialyse a servi de référence.

Concentration de la protéine : 1 à 4 mg/ml.

Méthode :

La sédimentation a été faite à 44 000 t/min. à la température de 20°C (contrôle par l'accessoire standard RITC), et a été suivie à l'aide du système Schlieren (angle du diaphragme : 50°). Un cliché a été pris toutes les 16 min., le premier (t=0) lorsque la vitesse nominale a été atteinte. La position des pics sur chaque cliché a ensuite été mesurée à l'aide du microcomparateur.

Le volume spécifique partiel de la protéine a été déterminé en mesurant les densités exactes du tampon de référence et

de la solution de protéine au moyen du densimètre, la concentration de la protéine a été déterminée par la méthode de Lowry.

II.3.9 Isoelectrofocusing

La technique développée par Haglund ⁶² a été utilisée.

Matériel

Solution anodique : Acide phosphorique 0.2 ml
 Eau distillée 14 ml
 Sucrose 12 g

Solution cathodique : Ethylène diamine 0.2 ml
 Eau distillée 10 ml

variante : NaOH 1/100 M

Solution d'ampholines :

A) faible densité : Ampholine LKB 40% 0.6 ml
 Eau distillée 51.5 ml
 Solution de protéine
 à analyser 2 ml

B) forte densité : Ampholine LKB 40% 1.8 ml
 Sucrose 26 g
 Eau distillée 37 ml

Méthode

24 fractions de densité décroissante ont été préparées de la manière suivante : n x 0.2 ml de la solution A (n variant de 0 à 23) ont été introduits dans les fractions, lesquelles ont été complétées à 4.6 ml avec la solution B., le volume des 24 fractions correspondant à la capacité de la colonne LKB (110 ml).

La solution anodique, les 24 fractions d'ampholines (par ordre décroissant de densité) et la solution cathodique ont été introduites successivement dans la colonne. Le tout a été maintenu à la température de 7°C au moyen d'un bain à circulation, et un courant de 12 mA a été appliqué à la colonne. Lorsque après quelques heures le courant est tombé à 1 mA, la tension a été ajustée à 500 V et maintenue à cette valeur

pendant 48 à 72 heures.

Au bout de ce temps, les protéines ayant atteint leur point d'équilibre dans le gradient de pH, le contenu de la colonne a été élué à l'aide d'une pompe péristaltique, à la vitesse de 30 ml/h, et collecté par fractions de 2 ml.

Dans chacune d'elles, le pH a été mesuré avec une précision de 1/100 d'unité de pH, et l'activité enzymatique dosée.

II.3.10 Filtration sur gel (gel-sieving)

Matériel

Sepharose 4B

Sepharose 6B

Sephadex G-150

Sephadex G-200

Tous ces gels ont été équilibrés dans du tampon phosphate de potassium 0.1 M pH 7.5 .

Colonne 0.4 cm ϕ , 90 cm de hauteur

Colonne 4.0 cm ϕ , 60 cm de hauteur

Méthode

A) Estimation du poids moléculaire des protéines

0.2 ml de solution de protéine (2.5 mg/ml) ont été appliqués sur la colonne de 0.4 cm de diamètre, et la protéine a été éluée à la vitesse de 1 ml/h avec le tampon d'équilibration. le déroulement de la chromatographie a été suivi au moyen d'un moniteur Uvicord LKB équipé d'une microcellule construite au laboratoire (0.07 ml de volume, 1.2 cm de chemin optique), et mesurant l'absorbance de l'effluent à 280 nm. Le temps de rétention des protéines a été estimé sur l'enregistrement , l'origine étant prise au moment de l'introduction de l'échantillon. Ce temps de rétention étant inversement proportionnel au logarithme du poids moléculaire de la protéine considérée, une droite de calibration a été construite graphiquement à l'aide de protéines globulaires de référence.

B) Chromatographie préparative

Ici, la colonne de 4 cm de diamètre a été utilisée. Le mélange contenant la GDH à purifier (au maximum 30 ml) a été appliqué sur le gel et élué avec le tampon d'équilibration, avec un flux de 50 à 60 ml/h., et collecté par fractions de 5 ml. L'absorbance de chacune d'elles a été mesurée à 280 nm, ainsi que son activité enzymatique éventuelle.

II.3.11 Microscopie électronique

A) Fixation des mitochondries

Un culot de mitochondries, gros comme une tête d'épingle, a été préparé, et recouvert de tampon phosphate de sodium pH 7.5, contenant 3% de glutaraldéhyde ⁹⁹, puis laissé reposer pendant 30 min. Ce culot a ensuite été incubé dans du fixateur frais pendant 90 min., puis transféré dans une goutte de tampon phosphate 0.13 M pH 7.5 contenant 5% de sucrose, coupé en petits blocs, qui ont été déposés dans du tampon frais pendant 15 min. Le tampon a ensuite été remplacé par une solution de tétroxyde d'osmium 1% tamponné à pH 7.4 et laissé reposer pendant 45 min. Les blocs ont alors été déshydratés par la série des alcools suivants :

Ethanol 50%	10 min.
Ethanol 70%	10 min.
Ethanol 95%	10 min.
Ethanol absolu 2 x	30 min.
Oxypropylène puriss	
(Fluka) 2 x	30 min.
Mélange Epon-oxypro-	
pylène 1 : 1	120 min.
Epon pur	120 min.

Les blocs ont été enrobés dans de l'Epon frais et laissés à 60°C pendant 24 h. pour mener la polymérisation à terme.

B) Coloration négative des protéines

Cette méthode permet l'observation de molécules protéiques en solution, déposées sur un film de carbone.

Les grilles support pour microscopie électronique ont été recouvertes d'un film de Parlodion et séchées 24 h.

Le film de Parlodion a été alors recouvert d'un film de carbone par la technique de l'évaporation sous vide.

Immédiatement avant l'emploi de la grille, le film de carbone a été rendu hydrophile par ionisation dans un arc électrique (effluage). Le pH a été maintenu à 9.0, par adjonction de NaOH 0.5 M sous forte agitation.

La grille ainsi préparée a été posée sur une goutte de protéine en solution pendant 15 sec, puis transférée sur une goutte d'eau bidistillée, puis sur une goutte de phosphotungstate de sodium 2% pH 7.5 pendant 45 sec. La grille a été séchée à l'aide d'un papier filtre appuyé sur la tranche, laissée quelques min. à l'air, et l'observation a pu avoir lieu.

II.3.12. Résistance thermique de la GDH

Des aliquots de GDH de cerveau ont été soumis pendant 30 min., en présence de tampon phosphate 0.05 M pH 7.5, à des températures échelonnées entre 15°C et 50°C, et l'activité résiduelle mesurée selon la méthode standard (cf. II.3.1).

II.3.13 Maléylation de la GDH¹⁴

10 mg de protéine ont été mis en solution dans 0.5 ml de tampon pyrophosphate de sodium 0.1 M pH 9.0. 60 à 80 mg d'anhydride maléique (fraîchement purifié par sublimation) ont été ajoutés, dissouts dans 0.6 ml de dioxane ultrapur conservé à 4°C. Le pH a été maintenu à 9.0 par adjonction de NaOH 0.5 M sous forte agitation. L'adjonction de l'anhydride maléique a été faite en 6 doses de 0.1 ml. Le tout a été laissé 1 h. à 4°C, puis dialysé contre de l'eau distillée pendant 24 h, avec de fréquents changements des eaux de dialyse, et enfin lyophilisé.

II.4. Résultats et discussion

II.4.1. Résultats

L'extraction de GDH à partir de mitochondries n'a de sens qu'en raison de la localisation intramitochondriale de l'enzyme. Cette localisation est mise en évidence par le fait que les homogénats de cerveau ne présentent aucune activité GDH tant que l'intégrité des mitochondries est préservée (contrôle par la microscopie électronique). Cela signifie de plus que les substrats (NAD^+/NADH) ne peuvent traverser la membrane mitochondriale pour atteindre la GDH située à l'intérieur.

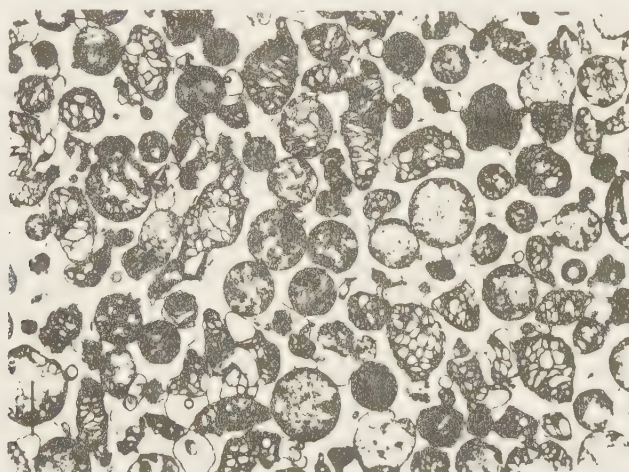


Fig. 1 Coupe d'une préparation de mitochondries de cortex cérébral. Préfixation à la glutaraldéhyde 2% tamponnée à pH 7.5, et fixation au tétroxyde d'osmium 1%.

La figure 1 montre une préparation de mitochondries réalisée par la méthode décrite au paragraphe II.2.1. Trois faits sont à relever : le faible taux de contamination par des particules étrangères (synaptosomes, microsomes) en regard de la simplicité de la méthode de préparation, la coexistence de deux états énergétiques des mitochondries, et enfin le fait que la membrane externe des organelles est souvent déchirée, mettant en contact direct avec le milieu tous les niveaux externes de la mitochondrie. Or, de telles préparations n'ont aucune activité GDH mesurable. Il faut en con-

clure que GDH ne se trouve ni sur la membrane externe, ni dans l'espace intermembranaire, ni fixé à la surface externe de la membrane interne. GDH est en solution dans le surnageant des mitochondries traitées aux ultrasons (sonication), puis centrifugées 60 min à 27 000 x g (cf.II.2.3), donc elle se localise dans la matrix .

Cette localisation intramitochondriale suggère une méthode très élégante de préparation de GDH, permettant d'éliminer avant toute chromatographie les protéines sériques, nucléaires et cytoplasmiques. Mais tout repose sur la conservation de l'intégrité des mitochondries, jusqu'au stade de la sonication, intégrité qu'il est difficile de garantir, lorsqu'on travaille avec de grandes quantités de cerveaux, dont l'état de fraîcheur n'est pas toujours suffisant. Dans les abattoirs semi-industriels auxquels nous nous sommes adressés (abattoirs de Genève et Micarna, Courtepin FR), il se passe environ 3 h entre l'abattage et le prélèvement des cerveaux, ce qui entraîne un rendement plus faible qu'avec la méthode de la poudre acétonique. Aussi, pour la préparation de GDH, la poudre acétonique reste le matériel de départ le plus avantageux. Aussi, par la suite seule la poudre acétonique sera-t-elle utilisée.

Préparation de poudre acétonique de cerveau ²⁵:

Cette technique est tout à fait traditionnelle, si ce n'est le travail à -20° qui impose, pour éviter autant que possible la condensation de l'humidité atmosphérique, de filtrer aussi rapidement que possible après chacune des extractions. La viscosité élevée du butanol est un obstacle à la filtration rapide que l'on surmonte par l'adjonction de 5 litres d'acétone, avant la filtration.

Purification de GDH de cerveau de boeuf :

De nombreux essais ont conduit à une procédure de purification simple comportant des étapes rapides, qualité essentielle pour éviter une prolifération bactérienne qui s'est montrée particulièrement spécifique des fractions contenant la GDH. Dans le but d'abréger les chromatographies sur Sephadex A-50, l'élution par gradient de densité a été remplacée par

un saut de molarité en KCl de 0 M dans le tampon d'équilibration à 0.15 M , ce qui ne réduit en rien la résolution dans le domaine qui nous intéresse.

Les précipitations au sulfate d'ammonium se sont révélées très efficaces tout en offrant un rendement élevé (plus de 95%) en présence de 2-mercaptoéthanol 0.1 % . De plus sous la forme précipitée l'enzyme est plus stable que sous toute autre forme. Il faut préciser que le sulfate d'ammonium a été introduit sous forme solide, ce qui entraine un abaissement du pH de la suspension, sans dépasser toutefois 1.5 unités pH pour 50 % de saturation (Fig. 2), abaissement favorable à la précipitation .

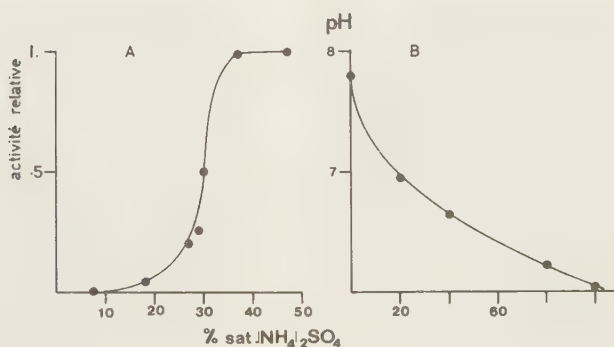


Fig. 2 a) Courbe typique de précipitation au sulfate d'ammonium de GDH de cerveau de boeuf à partir d'un extrait partiellement purifié (après une chromatographie sur DEAE sephadex A-50). En ordonnée figure l'activité enzymatique retrouvée dans le précipité rapportée à l'unité.

b) Abaissement du pH provoqué par l'adjonction de sulfate d'ammonium solide à un tampon phosphate de potassium 0.1 M pH 8.0 .

La figure 2 donne une courbe de précipitation caractéristique au stade de purification précédant la filtration sur gel.

Le poids moléculaire élevé de GDH distingue cet enzyme de la plupart des autres protéines présentes dans les extraits de cerveau, ce qui donne un critère de purification très sélectif, mis à contribution dans les étapes de filtration sur gel .

Le progrès de la purification a été suivi par électrophorèse sur polyacrylamide ou agarose à chaque étape, et par l'évolution du rapport protéines totales sur activité GDH mesurés respectivement par la méthode de Lowry et par le test standard d'activité décrit sous II.3.1 , qui a pour unités des mg équivalent de GDH de foie de boeuf (Boehringer). Ce rapport passe de 260 : 1 dans l'extrait brut à 2 : 1 pour l'enzyme pur cristallisé, soit une purification de 130 fois.

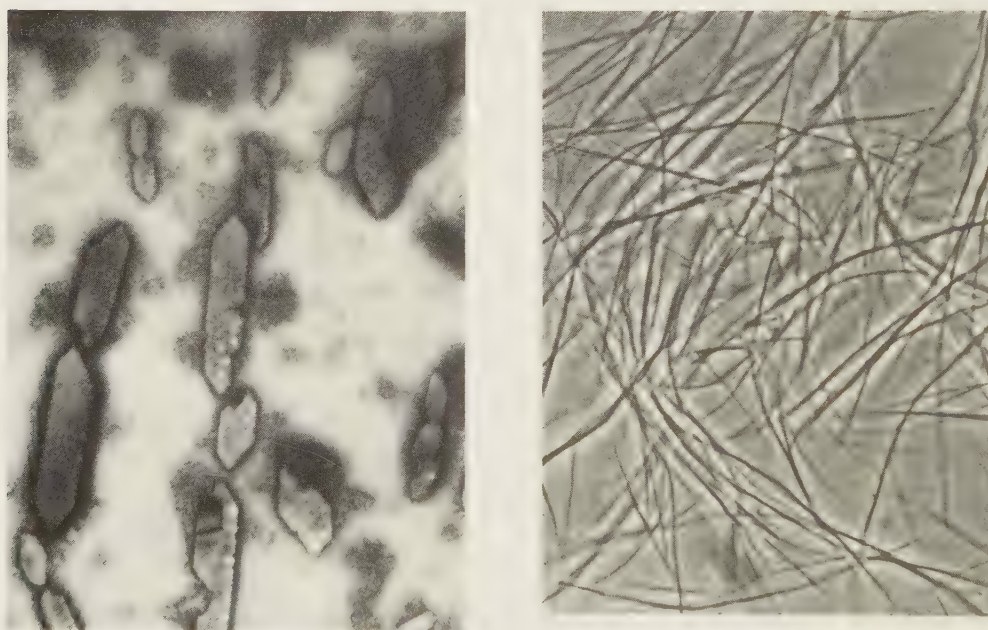


Fig. 3 Cristaux de GDH de cerveau de boeuf photographiés, à droite, au microscope optique en contraste de phase, et à gauche, au microscope électronique (JEM T7) avec une coloration négative.

L'enzyme de cerveau pur est, dans les conditions du test utilisé, un peu moins actif que celui du foie de boeuf (50 %), fait déjà signalé par McIlwain ⁹⁸.

Les électrophorèses sur polyacrylamide présentent en général plusieurs bandes GDH-actives, qu'il faut attribuer à un

seul enzyme migrant sous la forme, soit de protomère, soit d'hexamères ou de polymères (cf. définition) ; les protomères reforment des hexamères actifs lors du test d'activité. l'équilibre constant existant entre ces formes de la structure quaternaire ^{16 17} est responsable des trainées observées au niveau de chaque bande.

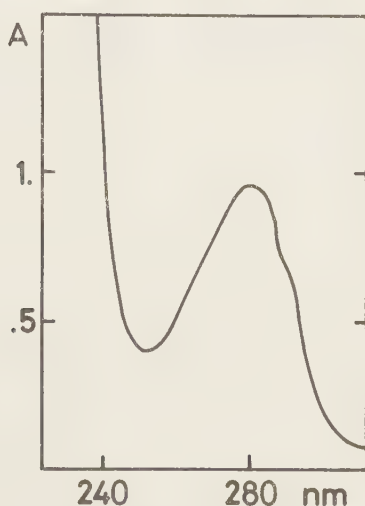


Fig. 4 Spectre UV de GDH de cerveau cristallisée

La mobilité relative de l'enzyme du cerveau a été étudiée sur gels d'agarose, gels dans lesquels l'effet de filtre moléculaire est négligeable (à la concentration de 1% en agarose) vis-à-vis de l'effet de charge.

La mobilité est alors donnée par l'expression :

$$M = \frac{Z * e}{6 \pi * E * r} * K$$

où Z = nombre de charges

e = charge de l'électron

E = viscosité du milieu

r = rayon de Stokes de la particule hydrodynamique

K = facteur de proportionnalité caractéristique du gel

Pour deux protéines de même dimension, migrant dans le même milieu et dans le même champ de potentiel électrique, le rapport M_1/M_2 est égal au rapport des charges nettes Z_1/Z_2 .

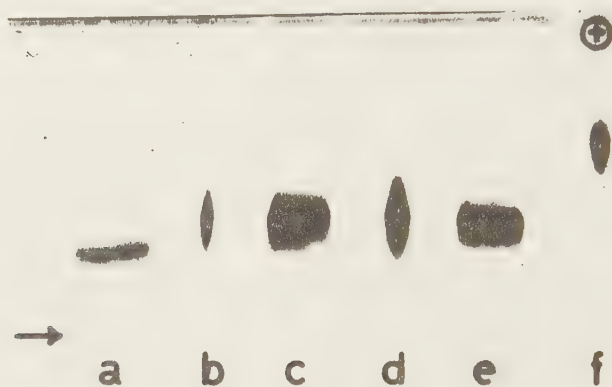


Fig. 5 Electrophorèse sur agarose 1% dans un tampon véronal pH 8.6 , de GDH de foie de boeuf, de cerveau de boeuf et référence d'albumine colorée au bleu de bromphénol.

La figure 5 montre une électrophorèse de GDH de foie de boeuf (Boehringer, Mannheim, Allemagne), de GDH de cerveau de boeuf, et témoins d'albumine colorée dont la mobilité est prise comme unité . Les mobilités relatives rapportées à la serum albumine sont les suivantes :

protéine	mobilité
sérum albumine (boeuf)	1.000
GDH de cerveau (boeuf)	0.597
GDH de foie (boeuf)	0.445

Le rapport des charges GDH de cerveau/GDH de foie est de 1.34 ce qui signifie que GDH de cerveau possède 34 % de charges négatives (charge nette) en plus que GDH de foie à pH8.6

Les figures 6 et 7 représentent la localisation de GDH respectivement de foie et de cerveau de boeuf dans le gradient de pH d'une isoélectrofocalisation ("isoelectrofocusing"). Les points isoélectriques mesurés pour ces deux enzymes sont :

protéine	gradient pH	point isoélectrique
GDH (foie)	3 - 10	5.45
GDH (foie)	3 - 6	5.30
GDH (cerveau)	3 - 10	4.86
GDH (cerveau)	3 - 6	4.92

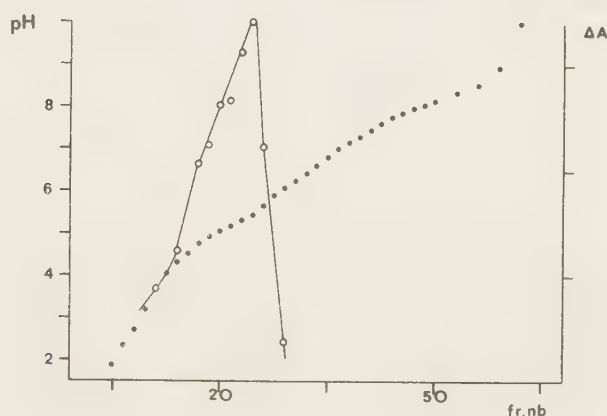


Fig. 6 Isoélectrofocalisation de GDH de foie de boeuf (Boehringer) dans un gradient d'ampholines LKB, domaine de pH 3 à 10 .

Résistance thermique : le traitement de 30 min à une température croissante (II.3.12) se traduit par la courbe d'inactivation de la figure 8 . Les températures inférieures à 40° produisent une inactivation de moins de 20 % . Entre 40° et 50° l'activité résiduelle tombe pratiquement à zéro.

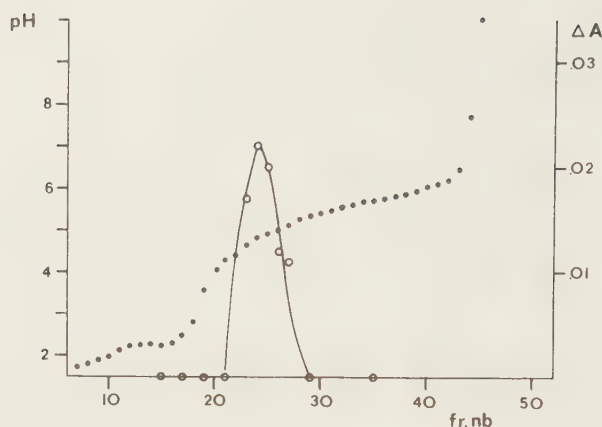


Fig. 7 Isoélectrofocalisation de GDH de cerveau de boeuf dans un gradient d'ampholines pH 3 à 6.

● : pH ; -o- activité enzymatique

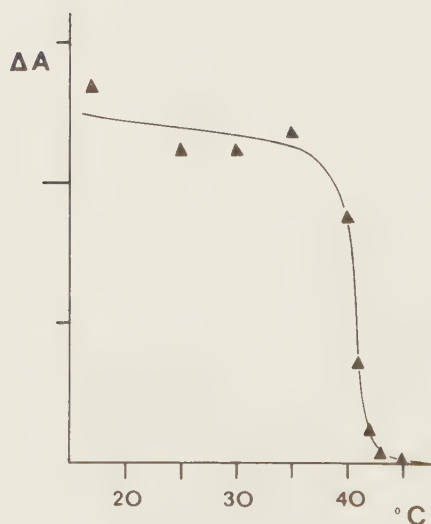


Fig. 8 Courbe de désactivation par un traitement de 30 min à des températures comprises entre 15° et 50°. Activité en unités arbitraires.

Poids moléculaire et structure quaternaire

Les résultats rapportés ici reposent sur quatre méthodes :

- a) gel sieving (II.3.10)
- b) électrophorèse sur polyacrylamide-SDS (II.3.7)

- c) ultracentrifugation analytique (II.3.8)
- d) observation de la protéine au microscope électronique (II.3.11)

a) gel sieving ou filtration sur gel :

Si l'on admet une relation linéaire entre le PM et les dimensions de la particule hydrodynamique, il est possible de déterminer le PM d'une protéine inconnue à l'aide du temps de rétention dans un filtre moléculaire comparé à celui de marqueurs (protéines de références). C'est ce qui a été fait avec des gels de Sepharose 4B et 6B .

Par la voie empirique, Ogston ¹⁰³ et Laurent et al. ⁸⁵ parviennent à une relation exponentielle entre le PM et le coefficient de partage défini par la relation suivante :

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_i}$$

Le PM est donné par :

$$PM = e^{K_{av}} + A \quad \text{II.2)}$$

où

V_e = volume d'exclusion

V_o = espace vide (void volume)

V_i = volume propre du gel $V_i = V_t - V_o$

V_t = volume total (bed volume)

Prenons le logarithme de l'équation II.2) :

$$\ln PM = \frac{V_e - V_o}{V_i} * B + C \quad \text{II.3)}$$

où $B = \ln A$.

Des expressions plus complètes ont été publiées, tenant compte de la forme de la particule, mais dans le cas traité ici les particules sont sensiblement sphériques et l'équation II.3) est satisfaisante. Le tableau II.1 résume les résultats expérimentaux .

TABLEAU II.1

protéine	Log PM	mobilité	PM
- Sépharose 6B (tampon d'élution avec 0.014% de chlorure de Zephiran (Biorad))			
Apoferritine	5.65	2.94	480 000
Myoglobine	4.25	8.74	17 800
Sérum albumine	5.11	5.44	130 000
" (mono)	4.83	6.74	65 000
Ovalbumine	4.65	6.95	45 000
GDH (cerveau)	----	5.52	115 000

- Sépharose 4B			
Myoglobine	4.25	60	17 800
Sérum albumine	5.13	51	130 000
" (mono)	4.83	--	65 000
Ovalbumine	4.65	53	45 000
GDH (cerveau)	----	40	346 700

- Sepharose 6B			
Myoglobine	4.25	21	17 800
Sérum albumine	4.83	17.18	65 000
" (dimère)	5.11	16.85	130 000
Apoferritine	5.65	13.6	480 000
GDH maléylée	----	18.2	57 500

Les protéines témoins sont des produits Sigma (revendus par Serva) spécialement prévues comme références de PM. Il faut remarquer que le coefficient de partage est remplacé ici par une grandeur équivalente, le temps de rétention mesuré sur les enregistrements de la cellule à flux continu (cf. Fig. 9) .

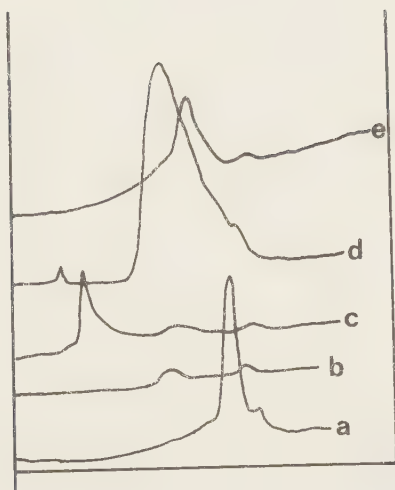


Fig. 9 Profils d'élution de filtration sur Sepharose 4B, colonne de 4 x 900 mm, vitesse d'élution : 1 ml/h . Tampon phosphate de potassium 0.1 M pH 7.5 .

a - myoglobine
b - γ -globuline
c - apoferritine
d - GDH de cerveau de boeuf
e - serum albumine

Electrophorèse sur polyacrylamide-SDS :

Introduite par Maizel ⁹⁴, Shapiro ¹²¹ et Weber ¹³⁸, cette méthode ne trouve sa justification qu'à la suite du travail de Reynolds & Tanford ¹¹¹ qui montre l'existence d'une relation stoechiométrique entre le nombre de résidus d'acides aminés et le nombre de molécules de SDS fixées sur les protéines. Suivant les conditions de concentration en SDS utilisées dans la dénaturation, ces auteurs montrent qu'il se fixe 2 molécules de SDS par résidu, ou 6.5 molécules de SDS par résidu ; quelle que soit la charge propre de la protéine, le complexe SDS-protéine possède donc 4N ou 13 N charges négatives unitaires (N = nombre de résidu), les charges de la protéine étant ainsi masquées.

Cela éclairci, voyons ce qui se passe dans l'électrophorèse. Deux effets s'additionnent : l'effet de charge et l'effet de filtre moléculaire. Le premier est caractérisé par une fonction linéaire, le second par une fonction exponentielle du PM, comme dans la filtration sur gel. Par conséquent l'effet

global sur la mobilité est une relation linéaire entre le logarithme du PM et la mobilité, ce qui correspond à l'expression définie sous II.3.7 .

Le tableau ci-dessous réunit les valeurs trouvées pour GDH de cerveau et quelques protéines de référence.

protéine	mobilité	log PM	PM
Lysozyme	0.706	4.155	14 300
Pepsine	0.437	4.544	35 000
Ovalbumine	0.358	4.653	45 000
Sérum albumine	0.240	4.813	65 000
GDH de foie (boeuf)	0.284	4.748	56 000 *)
GDH de cerveau (boeuf)	0.258	-----	61 000

*) déterminé par la séquence des acides aminés ¹³⁶

Avant l'électrophorèse, les protéines sont incubées à 90°, 2 - 3 min dans une solution de SDS 3%, ce qui provoque une dissociation des structures quaternaires. Les PM déterminés par SDS-électrophorèse sont donc ceux des protomères ou unités peptidiques.

Vitesse de sédimentation :

Cette méthode permet de déterminer le coefficient de sédimentation défini par les expressions suivantes :

$$S = PM * (1 - \bar{v} \rho) * \frac{D}{R * T} \quad \text{II.4)}$$

$$S = \frac{dx}{dt} * \frac{1}{\omega^2 \bar{r}} \quad \text{en unités Svedberg} \quad \text{II.5)}$$

$\bar{v}$ = volume spécifique partiel

ρ = densité du solvant

D = coefficient de diffusion

R = constante des gaz

T = température absolue

$\frac{dx}{dt}$ = vitesse de sédimentation

ω = vitesse de rotation du rotor

$\bar{r}$ = rayon moyen

Les valeurs de D utilisées pour le calcul du PM, ont été tirées des tables (Handbook of Biochemistry.C.R.C.Co., section C) pour des protéines globulaires de poids moléculaire comparable.

L'expression II.5) permet de calculer S à l'aide des mesures faites sur les clichés de la chambre photographique Schlieren. En introduisant la valeur de S ainsi obtenue dans l'équation II.4) remaniée, on obtient :

$$PM = \frac{R * T * S}{D(1 - \bar{v} \rho)} \quad \text{II.6)}$$

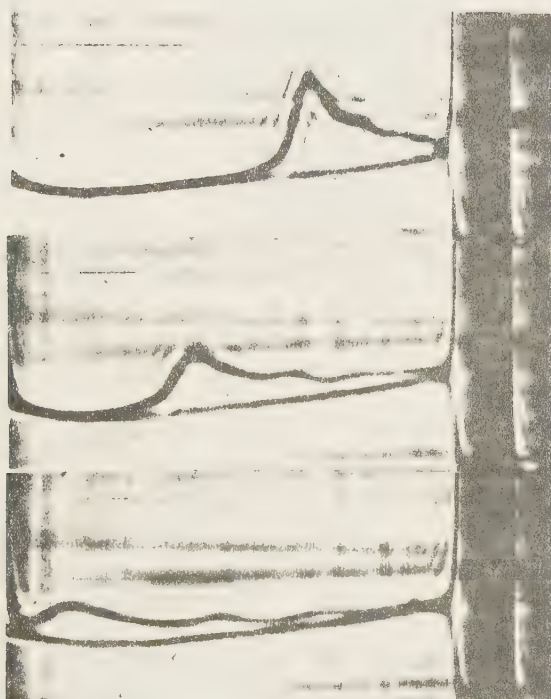


Fig. 10 Vitesse de sédimentation de GDH de cerveau de boeuf (2.7 mg/ml dans tampon phosphate 0.05 M pH 7.5, 5% en glycérol) à 20°. Accélération : 44 000 tours/min. Rotor An-D et cellule à double secteur. Temps d'exposition des clichés : 12 secondes. De haut en bas : t = 16 min , t = 32 min, t = 48 min. Des images similaires sont publiées par Bitensky et al.¹⁰, Eisenberg³⁷, pour GDH de foie.

Le volume spécifique partiel se calcule à partir de la densité d'une solution de GDH de concentration connue c, et de la densité du solvant :

$$\bar{v} = 1 - \frac{\rho_p - \rho_s}{c} \quad \text{II.7)}$$

La concentration a été déterminée par la méthode de Lowry. Le volume spécifique partiel de GDH de cerveau calculé sur la base des données décrites ci-dessus est de 0.711 .

$S_{20,w} * 10^{13}$	$D_{20,w} * 10^7$	PM
11.64	3.5 a)	288 600
17.26	2.54 b)	589 700
29.10	2.54 b)	994 240

a) valeur de la constante de diffusion de GDH de foie de boeuf d'après Sund & Burchard ¹²⁹.

b) valeur moyenne de D déterminée par Olson & Anfinsen ¹⁰⁴.

Les constantes de sédimentation de GDH de foie de boeuf trouvées dans la littérature sont les suivantes :

$S_{20,w} * 10^{13}$	auteurs
12.5	Frieden ⁵⁷
13.0	Sund & Burchard ¹²⁹
11.4	Reissler et al. ¹⁰⁸ , Eisenberg ^{36 37}
13.0	Markau et al. ⁹⁶
26.6	Olson & Anfinsen ¹⁰⁴
27.0 (0.115)	Markau et al. ⁹⁶ (force ionique)
31.0 (0.040)	" "
34.0 (0.040)	" + 4.4 mM NAD ⁺

La valeur du volume spécifique partiel de GDH de cerveau est plus faible que celle déterminée pour l'enzyme du foie (0.750 ¹⁰⁴, 0.735 ¹⁵). Cette différence s'explique vraisemblablement par la présence dans le tampon de 5 % de glycérine qui provoque une contraction de la protéine. (La glycérine a été ajoutée au tampon en raison de son effet stabilisant.)

Microscopie électronique

Bien que n'ayant pas la qualité des clichés dûs à Valentine^{134 135}, ou encore à Josephs & Borisky⁷², les photographies de la figure 11 et de la figure 12 donnent une information non négligeable sur la géométrie de l'unité active de GDH de cerveau. Le diamètre de l'unité active est de 80 Å environ. Les protomères sont groupés en hexamères pour constituer la plus petite unité active.

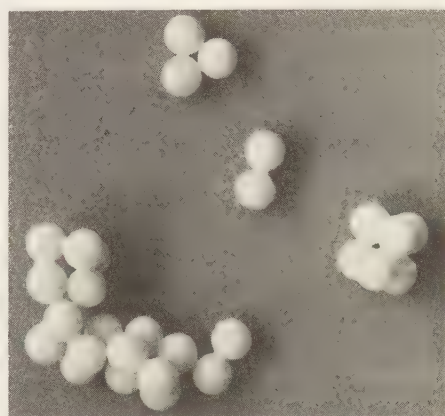
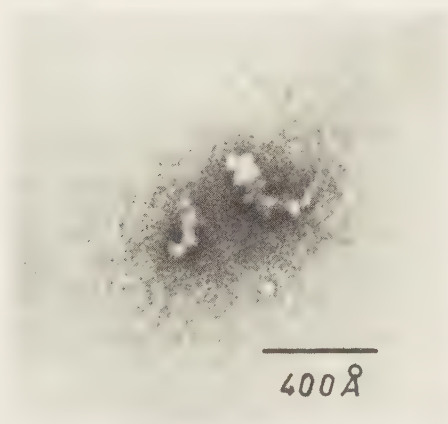


Fig. 11 Photographie de GDH de cerveau réalisée à l'aide d'un microscope électronique Jeol Co. modèle JEM T7. Méthode de l'adsorption sur film de carbone et coloration négative au phosphotungstate de sodium 2% à pH 7.5 . (à droite)

Fig. 12 Modèle de GDH correspondant à la figure 11 (à gauche)

Dans le tableau ci-dessous sont décrites les 4 géométries ponctuelles possibles pour un arrangement de six sous unités identiques.

A la lumière des clichés de la figure 11 il apparaît que la configuration IV est la plus vraisemblable. Celle-ci diffère de la configuration III par un décalage d'angle ϕ entre les triangles définis dans les deux plans de l'édifice moléculaire (cf. Fig. 12), ce qui transforme un axe de symétrie et de roto-inversion C_6 en un axe de rotation ternaire, d'où symétrie plus faible (cf. modèle de la Fig. 13). Il est toutefois impossible par ces images de mesurer l'angle ϕ , ni même de définir le signe de ce décalage. Seule

l'étude de la diffraction des rayons X par les cristaux permettra d'une part de confirmer le modèle géométrique proposé et d'autre part de définir la configuration absolue de l'hexamère ou unité active.

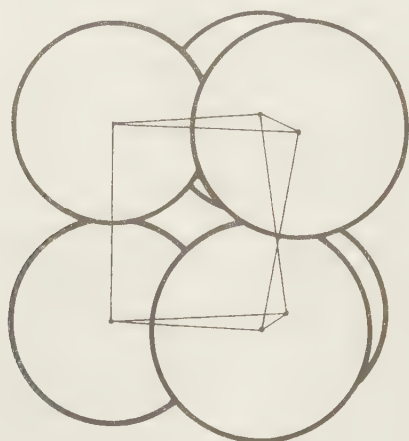


Fig. 13 Modèle de la structure quaternaire de GDH de cerveau en vue perspective. Les protomères sont figurés par des sphères.

Confirmant les expériences de vitesse de sédimentation et de gel sieving, les microphotographies montrent l'existence de dimères et trimères de l'unité active dans lesquels les unités sont juxtaposées linéairement

GEOMETRIES PONCTUELLES : MOLECULE DE 6 ELEMENTS IDENTIQUES

DISPOSITION DES PROTOMERES	SYMETRIE PONCTUELLE	NOTATION DE Klotz 76	NOMBRE DE		TYPES DE LIAISONS
			PREMIERS VOISINS	LIAISONS (total)	
I. Cyclique	C6/mmm	C6	2	6	1
II. Octaédrique	Cm3m	D3	4	12	1
III. Prisme					
trigonal	C6	D3	3	9	2
IV. Prisme					
trigonal	C32	-	3	9	2

II.4.2. Discussion

GDH de cerveau présente comme l'enzyme du foie ¹³³ un polymorphisme aussi bien en filtration sur gel et électrophorèse sur polyacrylamide, qu'en vitesse de sédimentation, polymorphisme relevant de l'équilibre association-dissociation de la structure quaternaire. Ainsi dans les gels d'agarose 1% où l'effet de filtration moléculaire est négligeable, une seule bande de protéine correspondant à GDH est décelable, ce qui montre l'homogénéité de la préparation quant à la charge nette.

Par contre, aussi bien en électrophorèse sur polyacrylamide (7.5 % en acrylamide) que dans les mesures de vitesse de sédimentation (concentration de GDH de 2.7 mg/ml), plusieurs populations de PM sont clairement visibles avec des valeurs d'environ 300 000, 600 000 et 1 000 000 daltons, soit une, deux ou trois unités actives par polymère. Ces derniers se trouvent dans un état d'équilibre d'association-dissociation tel qu'en solution diluée (<0.2 mg/ml) le monomère prédomine, alors qu'aux concentrations élevées (>2 mg/ml) les polymères de 2 à 4 unités actives sont prépondérants. Ceci peut être observé directement dans la figure 11. Il y paraît aussi clairement que la polymérisation est de type linéaire conformément à la description de GDH de foie présentée par Chun et al. ^{16 17}.

La filtration sur gel de GDH de cerveau (environ 0.2 mg par analyse) permet de définir le PM de l'unité active : 345 000 environ. Partant de cette base, les polymères de 2 et 3 unités ont des PM de 690 000 et 1 035 000. La divergence entre ces valeurs et celles obtenues à partir des coefficients de sédimentation ($S_{20,w}$: 11.64, 17.26, et 29.10) doit être attribuée essentiellement à l'incertitude sur le coefficient de diffusion, qui n'a pas été déterminé ici. Les données de la littérature à ce sujet sont pauvres et souffrent (du moins pour les moins récentes) de l'incertitude liée à la polydispersité. En effet, la forme de la particule

intervient dans le coefficient de diffusion, et si l'on peut encore assimiler l'unité active à une sphère, cela n'est plus possible pour les polymères qui manifestement ont une géométrie linéaire.

Dans un système polydisperse, c'est-à-dire où coexistent des particules de forme et de PM différents, la détermination d'un coefficient de diffusion "moyen" (il ne s'agit pas d'une véritable moyenne, mais de la somme des contributions de chacune des structures présentes) n'a pas de signification pour le calcul du poids moléculaire.

L'unité active se dissocie en protomères sous l'action des détergents (SDS), de l'urée et de la guanidine (hydrochlorure). Le bactériostatique chlorure de Zephiran (marque déposée de Biorad Laboratories, USA) induit une dissociation partielle en di-protomères de 115 000 daltons.

L'acétylation par des diacides carboxyliques tels que l'acide maléique, provoque une dissociation en protomères, qui subsiste après élimination de l'excès de réactif¹⁴. Il est alors possible de déterminer le PM du protomère par filtration sur gel dans les conditions usuelles, ce qui donne pour GDH de cerveau de boeuf, une valeur de 57'000.

Le groupe diacétyl (ici l'acide maléique) se fixe tout d'abord sur les lysines, puis sur les tyrosines, ce qui provoque une diminution de l'absorbance à 280 nm.

La valeur légèrement trop élevée (61 000) obtenue ici par électrophorèse sur polyacrylamide SDS est certainement accidentielle, car des mesures plus systématiques faites par J. Pache-Pfister dans notre laboratoire donnent un PM de $56\,500 \pm 3\,000$. Cette dernière valeur est en parfait accord avec la détermination par filtration sur gel de la protéine maleylée. De plus, elle correspond aux 56 100 calculés à partir de la séquence par Smith et al.^{11,80,84,107,109,122}. Le PM de l'hexamère est, par conséquent, de 335 000 à 340 000 daltons.

Sur le plan de la structure quaternaire, de même que du point de vue du poids moléculaire, la GDH de cerveau de boeuf ne se distingue en rien de l'enzyme du foie. Pourtant, la mobilité électrophorétique est différente, de même que les points isoélectriques : respectivement de 5.38 ± 0.10 et 4.89 ± 0.03 pour l'enzyme du foie et du cerveau. Ces caractéristiques de charge nette sont liées à la composition en acides aminés, dont les premières analyses ont montré des divergences en plusieurs points entre l'enzyme du foie et celui du cerveau. Il faut donc en conclure que ces deux enzymes sont deux isoenzymes de EC.1.4.1.3, dont il nous reste à étudier, dans la mesure où elles existent, les différences de comportement catalytique que l'on peut attendre de ces seules différences de structure primaire.

III Propriétés catalytiques de la GDH de cerveau

III.1. Détermination de l'activité de la GDH

Matériel

Spectrophotomètre double faisceau Perkin-Elmer 402, raccordé à un enregistreur Perkin-Elmer 165, ou Spectrophotomètre Beckman DB, tous deux comprenant l'accessoire de thermostatisation du compartiment des cuvettes.

Spectrofluorimètre Hitachi-Perkin-Elmer 204, raccordé à un enregistreur Perkin-Elmer 165.

Tampons, substrats et enzyme comme décrit dans chaque cas.

Méthodes

Le principe de base de ces méthodes consiste à suivre la production de NADH au cours de la réaction qui provoque une augmentation significative de l'absorbance à 340 nm dans le cas de la spectrophotométrie d'absorption, ou de l'émission à 460 nm lorsque la solution est soumise à une excitation à 350 nm dans le cas de la spectrophotométrie d'émission.

A) Estimation de la vitesse initiale de la réaction :

l'augmentation de l'absorbance du milieu réactionnel à 340 nm a été enregistrée pendant 5 min. La vitesse initiale de la réaction a été estimée en mesurant la pente à l'origine.

B) Test standard de l'activité enzymatique :

la cuvette contenant le milieu réactionnel a été introduite au temps zéro dans le spectrophotomètre, puis la variation d'absorbance notée après 1 min. et 5 min. La vitesse de réaction a été estimée en unités d'absorbance par min. ($\Delta A/\text{min}$) :

$$\Delta A/\text{min.} = \frac{A_{340}(5 \text{ min.}) - A_{340}(1 \text{ min.})}{4 \text{ min.}}$$

C) Mesure de l'activité enzymatique par spectrofluorimétrie : le monochromateur d'excitation a été réglé sur la longueur d'onde de 350 nm, et le monochromateur analyseur sur 460 nm.

L'enregistrement de la variation d'intensité d'émission a servi à déterminer la vitesse initiale de réaction par l'estimation de la pente à l'origine.

Les mesures de spectrofluorimétrie ont été faites à température ordinaire (ici 25°C environ.)

III.1.1 Effet du pH sur l'activité catalytique de la GDH

Matériel

Tampons : I : Phosphate de potassium 0.1 M, pH ajusté entre 5.0 et 8.0 par HCl concentré.
 Ia: même tampon, mais 1 M.
 II : Glycine 0.1 M, pH ajusté entre 7.0 et 10.0 par KOH 1 M.
 III : Borate de sodium 0.1 M, pH 7.5 à 10.0.
 IV : Tris-glycine 0.2 M, pH ajusté entre 7.0 et 10.5 par HCl concentré.

Substrats : L-Glutamate de potassium 1/3 M
 2-oxo-glutarate 1/3 M
 NH_4Cl 1/3 M
 NAD^+ 1 mg/ml et 5 mg/ml
 NAD(P)H 7.5 mM
 NVal 1/3 M
 5-O-Me-L-Glu 1/3 M

Méthodes

Trois séries d'expériences ont été réalisées dans les conditions suivantes :

A) Réaction inverse :

Substrats : L-Glu et NAD^+	(1 mg/ml)
Tampon I ou II	2.3 ml
NAD^+	0.5 ml
L-Glu	0.1 ml
Enzyme	0.1 ml

B) Réaction directe :

Substrats : 2-oxo-glutarate, NH_4Cl et NAD(P)H	
Tampon I, II ou III	2.7 ml
2-oxo-glutarate + NH_4Cl	0.1 ml
NAD(P)H	0.1 ml
Enzyme	0.1 ml

C) Réaction inverse :

Substrats : L-Glu, NVal, ou 5-O-Me-L-Glu, NAD ⁺ (5 mg/ml)	
Tampon IV	2.4 ml
Acide aminé	0.1 ml
(sauf NVal	0.2 ml)
NAD ⁺	0.1 ml
Enzyme	0.1 ml

La réaction a été enregistrée, et son pH mesuré après 5 min.
La vitesse initiale a été estimée.

III.1.2 Détermination de la spécificité de la GDH vis-à-vis de différents amino ou céto-acides

Matériel

Tampon : Phosphate de potassium 0.2 M pH 7.5
Substrats : Amino ou céto-acides (Fluka, CHR
sauf Lys-HCl, Hoffmann-La-Roche), 1/3 M dans le
tampon, la force ionique ayant été ajustée à
 $\Gamma/2 = 1.200$ par KCl, qui est la valeur obtenue
avec L-Glu 1/3 M.
NAD⁺ 3 mg/ml

Méthode

Tampon	2.7 ml
Substrat 1/3 M	0.1 ml
(conc. finale : 1/90 M)	
NAD ⁺	0.1 ml
Enzyme	0.1 ml

La réaction a été faite à 37°C, et l'activité exprimée en unités d'absorbance par min.

III.1.3 Cinétique du steady-state

III.1.3.1 Réaction en présence d'un large excès de NAD⁺ par rapport à la GDH

Cette expérience a été faite par spectrophotométrie de fluorescence, par l'excitation du NADH apparaissant dans le milieu réactionnel à 350 nm, et l'enregistrement de son émission à 460 nm.

Volume réactionnel	3.0 ml
contenant :	
L-Glu (Sigma, sel sodique)	22.22 mM
Phosphate de potassium pH 7.5	0.2 M
NAD ⁺ : concentration variable entre 0.01 et 0.1 mM	
Enzyme : concentration fixe	

III.1.3.2 Détermination des paramètres cinétiques

Matériel

Tampon : Tris-HCl 0.2 M pH 7.5

Substrats :

- NAD⁺ 0.6 mM
- NADH 0.6 mM
- L-Glu 1/3 M
- 2-oxo-glutarate + NH₄Cl 1/3 M

Enzyme : GDH $1.875 \cdot 10^{-6}$ M

Tous ces réactifs ont été mis en solution dans le tampon Tris-HCl 0.2 M pH 7.5

Méthode

Les réactions inverse et directe ont été testées en faisant varier successivement les concentrations de l'acide aminé (resp. céto-acide) dans le domaine de 1 à 120 mM d'une part, et du coenzyme dans le domaine de 1 à 160 μ M d'autre part, et ce dans un volume réactionnel de 3.0 ml. La réaction a été conduite à 25°C, la variation d'absorbance à 340 nm enregistrée et la pente à l'origine déterminée.

Traitement des résultats

Les graphes suivants ont été établis :

A) Graphe du premier ordre :

$1/V$ = fonction linéaire de $1/S$

soit $1/V = f(1/\text{NAD}^+)$

$1/V = f(1/\text{L-Glu})$

B) Graphe du deuxième ordre :

Pente et ordonnée à l'origine

soit Pente = $f(1/\text{L-Glu}), f(1/\text{NAD}^+)$

Ordonnée à l'origine = $f(1/\text{L-Glu}), f(1/\text{NAD}^+)$

Le calcul des paramètres de l'équation de Lineweaver-Burk a été fait à l'aide du programme FORTRAN CINSTAT (voir appendice).

III.1.3.3 Inhibition par l'acide D-glutamique

Matériel

Tampon : Tris-HCl 0.2 M, pH de 7.5 à 9.0, 25°C

Substrats :

NAD^+ fixe : 0.25 mM

L-Glu variable, de 0 à 30 mM

D-Glu variable, de 0 à 30 mM

Méthode

Dans des conditions standard de concentration en NAD^+ , la vitesse initiale de la réaction inverse a été mesurée, en faisant varier successivement les concentrations de L-Glu et de D-Glu, et ce à différents pH compris entre 7.5 et 9.0.

Traitement des résultats

Les graphes suivants ont été établis :

A) Graphe du premier ordre :

$1/V = f(1/\text{L-Glu})$, à plusieurs concentrations fixes de D-Glu,

B) Graphe de Dixon :

$1/V = f(\text{D-Glu})$, qui a déterminé la constante d'inhibition,

C) Graphe du deuxième ordre :

Pente et ordonnée à l'origine en fonction de la concentration de l'inhibiteur (cf. III.1.3.2)

III.1.3.4 Réaction en présence d'AMP

Matériel

Tampon : Tris-HCl 0.2 M pH 8.5, 25°C

Substrats :

NADH : 34 et 340 μ M

NAD : 40 μ M

NH₄Cl : 12 mM

2-oxo-glutarate : 0.5 à 6 mM

L-Glu : 1 à 30 mM

Nucléotides :

5'-AMP : 2.7 mM

2':3'-AMP : 2.56 mM

Méthode

Les réactions inverses et directes ont été mesurées. Les concentrations en substrats et en nucléotides ont été variées successivement.

III.1.3.5 Réaction en présence de GTP

Matériel

Tampon : Tris-HCl 0.2 M pH 7.5, 25°C

Substrats :

NAD : 4 μ M et 400 μ M

L-Glu : 60 mM

Nucléotide :

GTP (Fluka puriss.) 2mM

III.1.3.6 Réaction en présence de sérotonine

Matériel

Tampon : Tris-HCl 0.2 M pH 7.5, 25°C

Substrats :

NAD : 4 μ M et 400 μ M

L-Glu : 60 mM

Sérotonine : 3.14 mM

III.2.1. Spécificité de la GDH de cerveau

La spécificité enzymatique se traduit principalement par une discrimination à deux niveaux :

- configuration absolue du carbone asymétrique
- nature de la chaîne latérale

Dans le cas particulier de la GDH, le substrat fixé, L-Glu, ne doit pas être soumis à des tensions internes qui soient en opposition avec le changement d'hybridation (sp^3 en sp^2) de son carbone asymétrique (carbone α).

La méthode la plus simple de l'étude de la spécificité et de la configuration du site catalytique, est la détermination de l'activité relative de l'enzyme avec des substrats voisins par leur structure chimique du substrat naturel. Les courbes d'activité en fonction du pH apportent également de précieux renseignements.

La GDH catalyse la réaction décrite par l'équation 1.3). Les couples de réactants, L-Glu / 2-oxoglutarate et NAD^+ / $NADH$ sont les "substrats" normaux de l'enzyme. Du point de vue physiologique, il est concevable de leur substituer d'autres acides aminés et céto-acides et d'autres dinucléotides.

Etudions tout d'abord le coenzyme.

C'est une des caractéristiques de la GDH de cerveau de boeuf d'être active aussi bien avec NAD^+ / $NADH$ qu'avec NAD^+P / $NADPH$, ce qui en fait un enzyme du type EC.1.4.1.3, tout comme son homologue du foie. Les courbes d'activité relative pour les deux dinucléotides (Fig. 14), en fonction du pH, sont presque superposables, mais l'activité absolue au pH optimum (maximum d'activité mesurée dans les conditions décrites sous III.1.1) est de 25% plus faible avec $NADPH$ qu'avec $NADH$. Le pH optimum pour le sens direct est de 7.8; il est compris entre 8.5 et 9.0 dans le sens inverse.

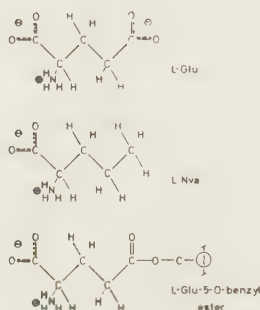
La présence du groupe phosphate en position 2' de l'adénosine ne modifie pas les pH optima. C'est à peine si la courbe s'étale un peu plus au-dessous de pH 7.5. L'inhibition "fonctionnelle" de 25 % constatée ici pour le nucléotide 2'-phosphate est à rapprocher du fait que l'activité avec l'un et l'autre dinucléotide est plus faible (15% avec NADH, 70% avec NADPH) dans le tampon phosphate que dans le tampon glycine ou borate (100%), et la courbe d'activité versus pH présente un étalement similaire aux pH inférieurs.

La comparaison des graphes -pH pour le L-Glu et le L-glutamate-5-O-méthyl-ester (coenzyme : NAD^+) montre que le groupe ester ne modifie ni le pH optimum, ni la forme de la courbe au-dessus de cet optimum, alors qu'il diminue considérablement l'activité aux pH inférieurs. Cela signifie globalement que la formation et / ou bien la réactivité du complexe enzyme-substrat est altérée par la présence du groupe méthyl-ester, soit par un effet stérique, soit par l'absence de charge négative sur le carbone 5 du substrat.

Aux pH optima respectifs les activités rapportées à L-Glu (100%) sont de 24.2 % et 20.8 % avec L-glutamate-5-O-méthyl-ester respectivement L-Nva, soit une différence de 3.4 % entre ces deux pseudo-substrats. Or L-Nva définit un encombrement stérique comparable à celui du substrat naturel; seule distinction, un groupe hydrophobe méthyle remplace un carboxyle ionisé sur le carbone 4. La présence de la charge négative favorise la disposition du substrat dans une configuration adéquate à la catalyse sur le site actif. Sans être très significative, la différence de 3.4 % en faveur de l'ester signalée ci-dessus, peut être imputée au caractère nucléophile que conserve le carboxyle estérifié.

La courbe de la L-Norvaline (Fig.15 b) présente un pH optimum sensiblement plus élevé que celui de L-Glu ou de son ester, soit pH 9.9, et une activité relative de 50 % sur la branche descendante à pH 10.1. Comparons dans le tableau ci-dessous les pK de la fonction amine- α avec le pH correspondant à une activité relative de 50 %.

substrat	pH 50% d'activité	pK
L-glutamate	9.3	9.3
L-glutamate-5-O-méthyl-ester	9.3	9.3
L-norvaline	10.1	9.8 à 10.5



La correspondance parfaite existant entre les deux colonnes de droite, indique que la branche descendante de la courbe d'activité en fonction du pH est superposée à la titration du groupe α -amino du substrat, et que celui-ci doit être ionisé pour orienter le substrat correctement sur le site catalytique.

La GDH de cerveau aussi bien que celle du foie est incapable d'oxyder l'énanthiomère dextrogyre de l'acide glutamique, bien que celui-ci se fixe sur le site catalytique (cf. inhibition compétitive par l'acide D-glutamique), quelque soit son état d'ionisation. L'enzyme distingue donc la structure stéréochimique du carbone α ainsi que la nature de la chaîne latérale de l'acide aminé qui lui est présenté.

Dans le tableau III.1 se trouvent réunies les valeurs de

l'efficacité relative de GDH, de cerveau et de foie de boeuf, ainsi que de *Neurospora crassa* à transformer des substrats (amino-acides et céto-acides) de structures diverses. L'activité relative (100% pour le substrat naturel) avec les céto-acides est sensiblement plus basse qu'avec les amino-acides correspondants, ce qui rend compte de l'importance de l'amine α dans la formation du complexe enzyme-substrat. En l'absence de ce point de fixation cationique, l'affinité du substrat pour l'enzyme est diminuée.

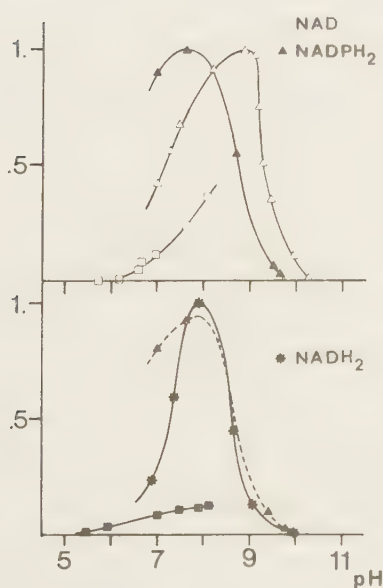


Fig. 14

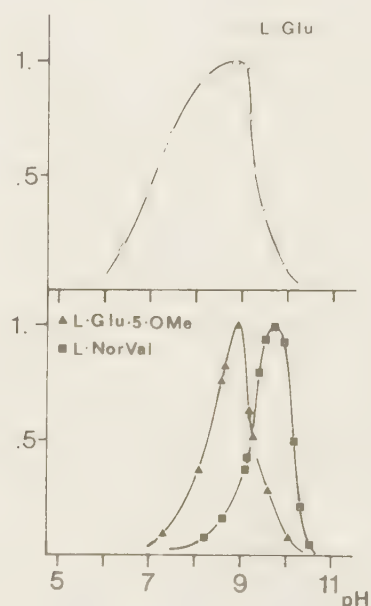


Fig. 15

Activité de la GDH de cerveau de boeuf en fonction du pH mesurée dans deux tampons : *) tampon Tris-glycine 0.2 M

**) tampon phosphate de potassium 0.1 M

Fig. 14

a) $-\Delta-$, NAD^+ *) ; $-\blacktriangle-$, NADPH_2 *) ; $-\square-$, NADPH_2 **)
b) $-\blacktriangle-$, NAD^+ *) ; $-\blacksquare-$, NAD^+ **) ; $-\ast-$, NADH_2 *)

Fig. 15 Activité versus pH de la réaction inverse pour trois acides aminés

(coenzyme : NAD^+) a) $-\Delta-$, L-Glu *)

b) $-\blacktriangle-$, L-Glu-5-O-méthyl-ester ; $-\blacksquare-$, L-Nva *)

Dans le sens de la réaction inverse, la fixation d'un pseudo-substrat dicarboxylique (L-Asp par exemple) par ses carboxyles terminaux réduit les possibilités de configuration de la chaîne intermédiaire. Celle-ci doit contenir 3 carbones. S'il n'y en a que deux, comme c'est le cas pour Asp, le substrat est étiré entre les deux points de fixation et le carbone α ne possède plus la mobilité requise pour la transition sp^3 en sp^2 (α -amino-acide en α -céto-acide). L'absence de carboxyle en position 5 est moins défavorable qu'une chaîne trop courte, comme le prouve l'activité de la L-norvaline.

La fixation du substrat sur l'enzyme est de caractère typiquement ionique. Le site récepteur contient au moins trois points de fixation : deux groupes anioniques de l'enzyme correspondent aux carboxyles du substrat, et un groupe anionique est l'homologue de l'amine α . La stéréospécificité absolue, le transfert direct d'un atome d'hydrogène de l'acide aminé sur le NAD^+ ^{91*}, et la transition de l'état d'hybridation sp^3 en sp^2 , impliquent une disposition précise du substrat sur le site catalytique, sans pour autant figer la molécule. Un mouvement de bascule doit rester possible au niveau du carbone α .

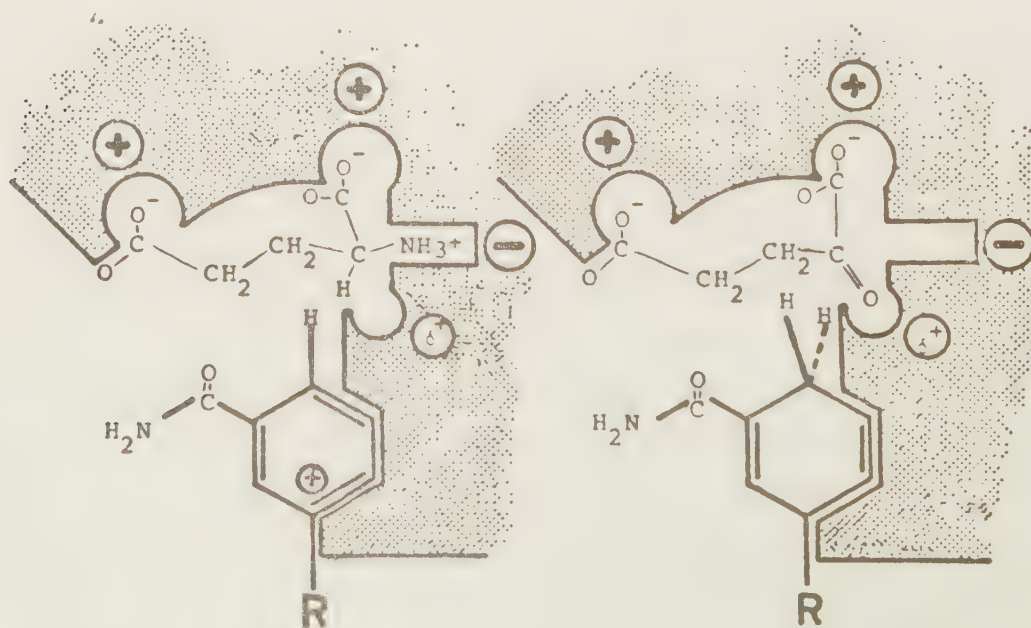


Schéma supposé du site catalytique de GDH

L'activité relativement élevée observée avec les esters de l'acide L-glutamique **) suggère que les deux sites anioniques sont situés près de la surface de l'enzyme, ou dans une cavité suffisamment vaste pour héberger des groupements aussi volumineux que benzyl-ester et tert-butyl-ester.

Pour conclure, la comparaison de la spécificité de l'enzyme du cerveau de boeuf avec celle des autres GDH, ne permet pas de distinctions significatives. Les différences dans la structure primaire de ces enzymes (mises en évidence par l'analyse globale des acides aminés, la mobilité électrophorétique et le point isoélectrique) n'affectent pas sensiblement la configuration du centre catalytique.

*) Les expériences décrites dans la référence 91 sont réalisées avec l'enzyme de foie de boeuf, et indiquent une spécificité β du transfert de l'hydrogène.

**) Des expériences réalisées avec l'enzyme du foie de boeuf ont montré que GDH peut très bien catalyser la déamination des diesters de l'acide glutamique, tels que L-Glu-1-0-Met-5-0-tert-butyl-ester.

TABLEAU III.1

SPECIFICITE DE GDH : comparaison de trois GDH
activité relative en fonction du substrat

substrat	GDH de foie de boeuf Struck & Sizer 128	GDH de Neurospora Barratt & Strickland ⁵	GDH de cerveau de boeuf
	1)	2)	3)
L-glutamate	100 %	100 %	100 %
L-norvaline	17	0.93	11.62
L- α -aminoadipate	-	1.1	-
L- α -aminobutyrate	2.3	0.31	-
L-leucine	1.7	< 0.43	-
L-valine	1.6	< 0.43	0.32
DL-norleucine	1.6	< 0.43	-
L-isoleucine	0.95	-	-
L-methionine	0.82	-	0.09
L-alanine	0.27	< 0.43	0.01
L-aspartate	-	0.77	0.25
L-phenylalanine	-	< 0.43	-
glycine	-	< 0.43	0.21
L-serine	-	-	0.84
L-lysine	-	-	0.46
L-thréonine	-	-	0.42
=====			
2-oxo-glutarate		100 %	
2-oxo-butyrate		2.25	
2-oxo-valérate		1.84	
2-oxo-propionate		1.62	
2-oxo-isocaproate		0.90	

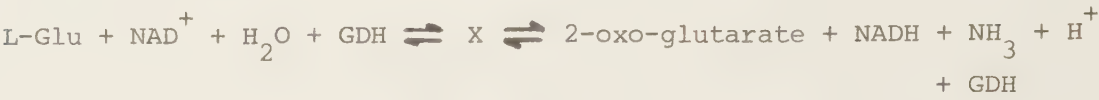
1) dans tampon Tris 0.1 M pH 9.0, excepté pour L-glutamate à pH 8.0

2) au pH optimum du cétoacide correspondant dans tampon Tris 0.2 M

3) dans tampon phosphate de potassium 0.2 M pH 7.5

III.2.2. Cinétique du steady state

Résultats expérimentaux de l'étude de la réaction inverse:



Les concentrations de l'eau et de H^+ restent sensiblement constantes en raison de l'effet tampon du milieu et du très large excès de la concentration de l'eau (55 M) qui est en même temps solvant. La réaction se réduit ainsi à un système à deux substrats et trois produits. Les figures 16 à 18 montrent les graphes de Lineweaver-Burk (double réciproque de la vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration du substrat), respectivement en fonction de NAD^+ et de L-Glu. Les paramètres déterminés à l'aide de ces graphes sont réunis dans les tableaux III.2.1 et III.2.2, et servent à l'établissement des graphes de second ordre des figures 19 et 20.

Les constantes de Michaelis pour NAD^+ et pour L-Glu, et la vitesse maximale (à concentration infinie des deux substrats) sont obtenues par extrapolation des graphes de deuxième ordre.

substrat: S	K_M^S (M)	V_M^S (Mxmin ⁻¹)
NAD ⁺	2.42×10^{-5}	9.180×10^{-6}
L-Glu	6.48×10^{-3}	9.180×10^{-6}
NAD ⁺ (faibles concentrations)	5.00×10^{-6}	3.304×10^{-6}

concentration en GDH : 20 µg/ml
tampon : Tris-HCl 0.2 M pH 7.5
mesure de la variation d'absorbance à 340 nm à 25° C.
absorption molaire de NADH à 340 nm : 6220

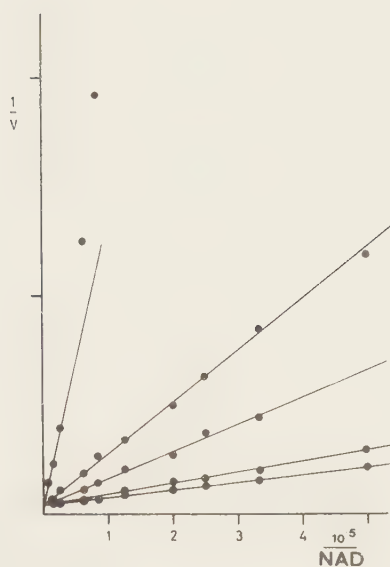


Fig. 16 Graphe de Lineweaver-Burk (concentrations en NAD^+ inférieures à $10 \mu\text{M}$) *)



Fig. 17 Graphe de Lineweaver-Burk (concentrations en NAD^+ supérieures à $10 \mu\text{M}$) *)

*) concentration en L-Glu respectivement de haut en bas de 2, 10, 20, 60 et 120 mM

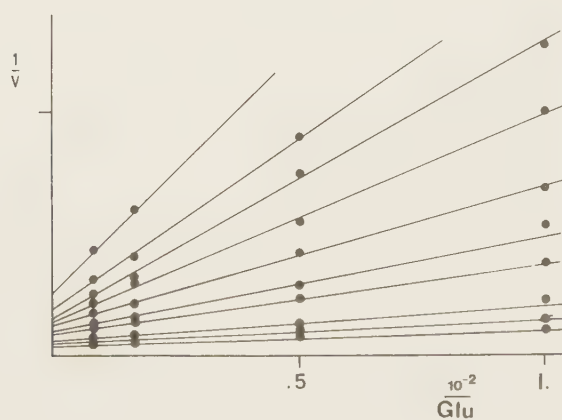


Fig. 18 Graphe de Lineweaver-Burk pour des concentrations en NAD^+ respectivement de haut en bas de 2, 3, 4, 5, 8, 12, 16, 40, 80, 160 μM . Substrat variable : L-Glu.

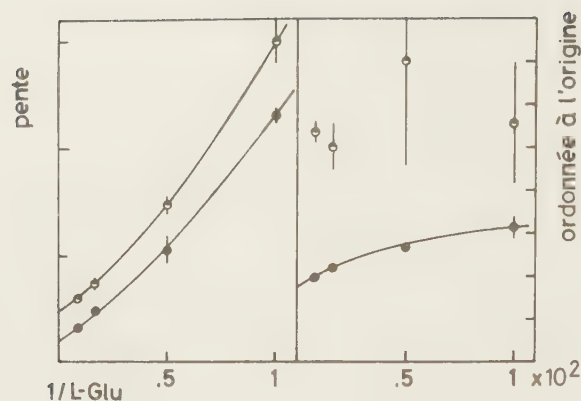


Fig. 19 Graphes de second ordre. Report des paramètres définis dans les figures 16 ($\circ$) et 17 ($\bullet$) avec les erreurs standard correspondantes.

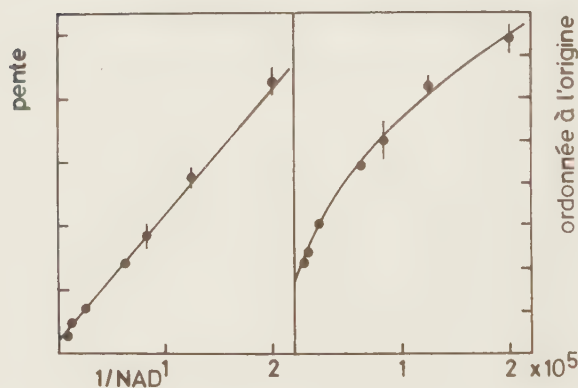


Fig. 20 Graphes de second ordre. Report des paramètres définis dans la figure 18 avec les erreurs standard correspondantes.

Connaissant la concentration de GDH dans ces expériences, il est possible de calculer la constante catalytique à partir de la vitesse maximale = $9.18 \cdot 10^{-6} \text{ M} \cdot \text{min}^{-1}$, ce qui donne 156 pour un poids moléculaire de GDH de 340 000 daltons. Il en résulte un Turnover number de 26 min^{-1} .

Les graphes de premier ordre, $1/v$ versus $1/\text{NAD}$, présentent une transition brusque entre deux phases pseudo-linéaires (cf. figure 21. Une troisième transition est décelable si l'échelle des abscisses est étendue) définissant les constantes K_{m1} , K_{m2} et V_{m1} , V_{m2} du tableau III.2.2. Ces transitions sont d'autant plus marquées que la concentration en L-Glu est plus élevée, ce qui suggère l'existence d'une interaction entre les sites des deux substrats. A la concentration de 2 mM en L-Glu, la transition due à l'excès de NAD n'est plus perceptible. Qualitativement, cette transition brusque, qui se traduit par une augmentation de la pente K_m/V_m et, parallèlement, par une diminution de $1/V_m$, est en fait une activation par excès de NAD. Le mode d'activation doit transparaître dans l'allure des graphes de second ordre. Ceux-ci sont typiquement non linéaires, sauf pour le graphe des pentes (K_m/V_m) en fonction de $1/\text{NAD}$ (fig. 20), qui est linéaire sur l'ensemble des concentrations utilisées, soit entre 2 et 160 μM en NAD.

Le graphe $1/V_m$ en fonction de $1/\text{NAD}$ est de type hyperbolique, ce qui traduit qualitativement, soit une activation progressive par NAD, soit la suppression graduelle d'une inhibition. Les graphes de la fig. 19 appellent des remarques semblables. La pente K_m/V_m reportée en fonction de $1/\text{L-Glu}$ décrit une parabole, dans les deux domaines de concentration en NAD. A faible concentration en NAD, $1/V_m$ est indépendant de la concentration en L-Glu, alors qu'aux fortes concentrations, une activation par L-Glu est vraisemblablement responsable de l'allure hyperbolique du graphe. Cela signifie que l'interaction entre les sites du substrat et du coenzyme n'a lieu que lorsque l'enzyme est saturé par NAD.

Dans les expériences décrites ici, le rapport substrat sur enzyme est tel que l'on peut s'attendre à une saturation de l'enzyme, définie uniquement par les constantes de dissociation des substrats.

Ainsi, les effets coopératifs se traduisent-ils par un déplacement de l'équilibre association-dissociation du complexe enzyme-substrat, c'est-à-dire une modification des constantes de dissociation, ce qui explique la non-linéarité des graphes de second ordre.

L'interaction entre les sites (hétérotropique) a lieu aussi bien dans le sens L-Glu sur NAD que NAD sur L-Glu, ce qui permet de penser avec Colen et al.²¹ à la fixation rapide et aléatoire des substrats (acide aminé et coenzyme) sur l'enzyme.

L'énergie libre de la réaction inverse de + 18.26 Kcal/mole (Burton & Krebs¹³) implique que l'équilibre final de la réaction est proche des conditions initiales de toutes les mesures faites ici, et la réaction ne se déroule pratiquement jamais selon l'ordre zéro. Les enregistrements de l'absorbance en fonction du temps sont hyperboliques.

TABLEAU III.2.1

NAD⁺ : substrat fixe

NAD ⁺ μM	pente Km/Vm x 10 ³	ordonnée à l'origine 1/Vm	Km x 10 ²	Vm x 10 ³	Coefficient de régression
2	10.02	129.20	7.75	7.74	-----
3	6.44 ± 0.61	100.50 ± 7.78	6.42 ± 1.19	9.95 ± 0.83	99.38
5	4.23	74.05	5.71	13.51	99.59
8	2.75	62.91	4.37	15.90	99.72
12	1.84	49.94	3.69	20.03	99.27
16	1.41	44.10	3.21	22.68	99.99
40	0.71	30.40	2.34	32.90	99.84
80	0.467	23.75	1.97	42.11	99.94
160	0.278	21.24	1.31	47.08	99.99

TABLEAU III.2.2

L-glutamate : substrat fixe
concentrations en NAD < 10 μ M

L-Glu mM	pente K_m/V_m $\times 10^3$	ordonnée à l'origine $1/V_m$	K_m $\times 10^5$	V_m $\times 10^2$	coefficient de régression
10	2.304 ± 0.070	50.62 ± 14.45	4.552 ± 1.27	1.975 ± 0.489	78.11
20	1.126	65.38	1.723	1.529	75.00
60	0.486	45.30	1.072	2.207	94.90
120	0.327	45.38	0.721	2.204	99.36

concentrations en NAD > 10 μ M

L-Glu	K_m $\times 10^5$	V_m $\times 10^2$
10	9.903 ± 1.45	3.316 ± 0.249
20	5.523	3.728
60	3.376	4.552
120	3.047	5.038

III.3. Cinétique enzymatique

III.3.1. Théorie générale

D'un point de vue très général, une réaction enzymatique est décrite par une série d'équations différentielles dans lesquelles figurent les K substrats X_i et les L produits Y_j , ainsi que les N états de l'enzyme E_n .

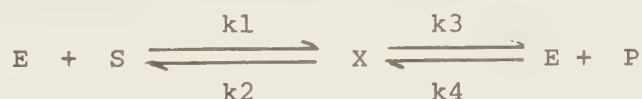
$$\frac{dE_n}{dt} = \text{fonction de } E_n, X_i, Y_j \quad \frac{dX_i}{dt} \text{ et } \frac{dY_j}{dt} = \text{fonction de } E_n, X_i, Y_j$$

Ces fonctions sont linéaires par rapport à chaque réactant ou état de l'enzyme.

A ces expressions différentielles s'ajoute une équation de conservation de l'enzyme :

$$E_0 = \text{somme des } E_n \text{ entre } n = 1 \text{ et } n = N$$

Prenons pour exemple le cas le plus simple d'une réaction monosubstrat et monoproduit ne comportant qu'un seul complexe de Michaelis intermédiaire X :



Admettons que la réaction est irréversible soit que $k_4 = 0$.

Les équations différentielles décrivant cette réaction sont :

$$\begin{aligned} \frac{dE}{dt} &= (k_2 + k_3) * X - k_1 * E * S \\ \frac{dX}{dt} &= k_1 * E * S - (k_2 + k_3) * X \\ \frac{dS}{dt} &= k_2 * X - k_1 * E * S \\ \frac{dP}{dt} &= k_3 * X \end{aligned} \quad \text{III.1)}$$

Equation de conservation de l'enzyme :

$$E_0 = E + X$$

Ce système d'équations différentielles ne possède pas de solution exacte. Il est nécessaire pour le résoudre, de faire une hypothèse simplificatrice, celle postulant l'existence d'un équilibre dynamique tel que :

$$\frac{dE_n}{dt} = 0 \quad \text{et} \quad \int_{t=0}^{t \text{ de la mesure}} \frac{dy_j}{dt} \ll y_{j_0} = \text{constante}$$

La vitesse est alors donnée par $\frac{dy_j}{dt}$ qui est une fonction de x_{i_0} , y_{j_0} et E_0 (pour $i = 1$ à K et $j = 1$ à L)
 Dans l'exemple ci-dessus, la solution des équations III.1 est :

$$v = \frac{k_3 * E_0 * S_0}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + S_0} \quad \text{où } k_3 * E_0 \text{ est la vitesse maximale de la réaction } V_M^S \text{ et } \frac{k_2 + k_3}{k_1} \text{ est la constante de Michaelis } K_M^S$$

$$v_0 = \frac{V_M^S * S_0}{K_M^S + S_0} \quad \text{III.2)}$$

Toute réaction enzymatique peut être exprimée sous cette forme, les paramètres V_M^S et K_M^S devenant des constantes apparentes s'il y a plusieurs substrats ou si le mécanisme est plus complexe que celui décrit par III.1) . V_M apparent et K_M apparent, sont des expressions contenant E_0 ainsi que les concentrations initiales de tous les réactants, sauf celui pris comme variable (= S) dans l'équation III.2) . Si la réaction est réversible ($k_4 \neq 0$), l'expression de la vitesse est donnée par :

$$v_0 = \frac{V_1 * V_2 \left(\prod_{i=1}^K x_{i_0} - \frac{1}{K_{eq}} * \prod_{j=1}^L y_{j_0} \right)}{\text{expression en } x_{i_0}, y_{j_0}, V_1 \text{ et } V_2}$$

(un exemple sera développé plus loin par la méthode de Cleland-King-Altman ^{18 19 20 75})

V_1 et V_2 sont respectivement la vitesse maximale de gauche à droite et de droite à gauche . Pour le système réversible le plus simple nous avons :

$$v_0 = \frac{V_1 * S - V_2 * \frac{k_4}{k_1} * P}{K_M + S + \frac{k_4}{k_1} - P}$$

où :

$$V_1 = k_3 * E_o$$

$$V_2 = k_2 * E_o \quad \text{et} \quad K_{eq} = \frac{k_1 * k_3}{k_2 * k_4}$$

$$v_o = \frac{V_1 (S - \frac{1}{K_{eq}} * P)}{K_M * V_2 + S * V_2 + P * V_1 * \frac{1}{K_{eq}}} \quad \text{III.3)}$$

et sous la forme utilisée par Cleland :

$$v_o = \frac{V_1 * V_2 (S - \frac{1}{K_{eq}} * P)}{K_M * V_2 + S * V_2 + V_1 * P * \frac{1}{K_{eq}}} \quad \text{III.4)}$$

Si l'on étudie la réaction avec $P_o = 0$, on admet généralement que P reste voisin de zéro pendant la durée de la mesure de la vitesse initiale, et on retrouve l'expression III.2), car les termes en P sont nuls, et il est possible de simplifier par V_2 l'expression III.4).

Comme nous l'avons signalé plus haut, les mêmes raisonnements permettent de donner une forme similaire à des mécanismes de réactions pluri-substrats. Les paramètres liés à un substrat seront fonction de la concentration des autres réactants. Pour définir les paramètres réels, il est donc nécessaire de répéter la détermination des paramètres apparents pour plusieurs concentrations de chacun des substrats.

L'équation III.2) est de forme hyperbolique, ce qui ne rend pas très aisé l'ajustement de ses paramètres aux valeurs expérimentales *). Aussi, lui préfère-t-on la forme linéarisée proposée par Lineweaver-Burk⁹² :

$$\frac{1}{v_o} = \frac{1}{V_M} + \frac{K_M}{V_M} * \frac{1}{S} \quad \text{III.5)}$$

dont l'ordonnée à l'origine est la réciproque de la vitesse maximale et la pente est le quotient de la constante de Michaelis et de la vitesse maximale. L'extrapolation, "S tend vers l'infini" ($1/S = 0$), permet donc de calculer V_M , alors que la pente définit K_M .

*) L'ajustement à l'hyperbole est cependant possible¹³⁹ dans certaines conditions définies dans la description de notre programme CINSTAT (cf. Appendice).

Soit une réaction à deux substrats A et B. Déterminons les paramètres apparents du substrat A (dans des graphes de Lineweaver-Burk de premier ordre) pour une série de concentrations du substrat B et réciproquement pour les paramètres de B . Il est alors possible de construire des graphes de second ordre en reportant les pentes K_M/V_M et les ordonnées à l'origine $1/V_M$ en fonction de la réciproque du substrat fixe, soit ici respectivement B et A. L'extrapolation de ces graphes à concentration infinie du substrat fixe définit une pente limite et une vitesse maximale limite d'où l'on peut tirer les constantes de Michaelis pour A et B et la vitesse maximale V_{max} correspondant à :

$$V_{max} = K * E_0 \quad \text{III.6)}$$

où K est la constante catalytique (= k_3 dans notre exemple)

Le turnover number est ainsi donné par :

$$TN = \frac{K}{\text{Nb. de sites par molécule d'enzyme}} \quad \text{III.7)}$$

où
$$K = \frac{V_M}{E_0}$$

Une autre voie d'exploitation des mesures cinétiques est l'établissement de diagrammes de Hill ⁶⁶ qui repose sur les considérations suivantes.

Soit un enzyme possédant n sites catalytiques par unité active : l'équilibre association-dissociation du complexe enzyme substrat est donné par le produit des constantes de dissociation individuelles de chaque site :

$$K_{diss} = \frac{E * S^n}{ES_n} \quad \text{III.8)}$$

Nous avons :

$$v = k * ES_n \quad \text{et} \quad V_{max} = k * E_0$$

or comme $E = E_0 - ES_n$ il résulte que

$$k * E_0 = V_{max} - v$$

La fonction de saturation des sites devient alors :

$$\frac{ES_n}{E} = \frac{v}{V_{max} - v} = \frac{S^n}{K} \quad \text{III.9)}$$

Prenons le logarithme des deux membres de l'égalité de droite de III.9) :

$$\log\left(\frac{v}{V_{\max} - v}\right) = n_H * \log(S) - \log(K) \quad \text{III.10)}$$

qui est l'équation de Hill pour des valeurs cinétiques, n_H est le coefficient de Hill dont la signification reste controversée car il comprend deux éléments principaux : le nombre de sites et l'interaction entre ces sites. Le coefficient de Hill n'atteint jamais la valeur exacte du nombre de sites, mais définit une valeur minimale du nombre de sites. Il peut être plus petit que l'unité dans le cas d'interaction homotropique négative. (cf. D.E.Koshland, in Boyer, P. " The Enzymes " Vol 1 (1970), Academic Press.) Cette forme de l'équation de Hill est d'autant plus significative que dans l'expression $v = k * ES_n$ la concentration des complexes contenant moins de n molécules de substrat par molécule d'enzyme est négligeable vis-à-vis de ES_n . Ceci est particulièrement vrai pour les enzymes suivant un mécanisme concerté de Monod¹⁰⁰.

III.4. Discussion

III.4.1. Mécanisme réactionnel

A notre connaissance, aucune étude de la cinétique classique de la glutamate deshydrogénase de cerveau n'a été publiée à ce jour. Cependant, de nombreuses publications ont paru au sujet de l'enzyme du foie de boeuf, de poulet, de roussette, etc., pour ne citer que les GDH de provenance animale (cf. Préambule).

Les premiers travaux sur la GDH de foie de boeuf sont dus à Olson & Anfinsen¹⁰⁵. Depuis, de nombreux autres ont paru, par contre, très peu concernant l'enzyme du cerveau. Toutes les informations dont nous disposons se rapportent par conséquent à l'enzyme du foie (de boeuf, de poulet, de roussette, etc) ou de microorganismes.

Il faut toutefois relever les rares travaux sur la GDH du cerveau. Celui d'Erwin⁴² traite de l'effet de l'AMP sur l'activité enzymatique, celui de Grisolia et al.⁶¹ décrit une préparation sommaire de l'enzyme.

Les nombreux travaux sur la GDH de foie dus à Olson & Anfinsen¹⁰⁵ et surtout à Frieden (articles publiés entre 1957 et 1969) n'ont pu préciser si le mécanisme de la réaction est séquentiel ordonné ou simplement aléatoire. Alors que Frieden⁵³ penche en faveur de la première alternative, Dalziel et Engel⁴⁰ préfèrent la seconde. Les études des états de transition (transient states) telles celles dues à Jallon et al.⁷¹, Vitorelli et al.¹³⁷, Malcolm⁹⁵, etc. mettent en évidence toute une série de complexes binaires et ternaires, ce qui est un argument supplémentaire en faveur d'un mécanisme aléatoire.

Au niveau du mécanisme chimique, il va de soi qu'il existe une voie préférentielle. Divers travaux ont montré (Hochreiter & Schellenberg^{67,68}, Nakamoto & Vennesland¹⁰¹) un transfert

direct d'un ion hydronium du carbone α de l'acide glutamique, sur la position 4 du cycle pyridinique de NAD^+ , avec une stéréospécificité β . Ce transfert conduit à la forme imino du glutamate, qui elle réagit avec une molécule d'eau pour former une molécule de 2-oxo-glutarate, une d'ammoniaque et un proton (cf. Fig. 21).

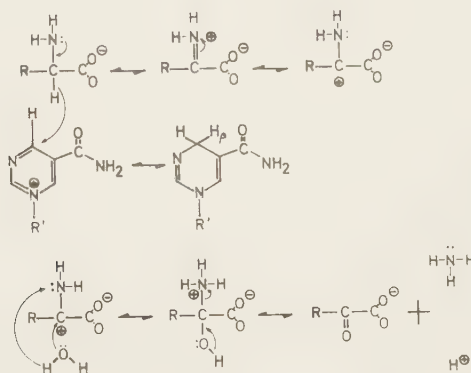


Fig. 21 Schéma du mécanisme chimique de l'oxydation déaminative de l'acide L-glutamique par GDH

Par contre, l'ordre de fixation des substrats n'est en rien déterminé par la séquence de la réaction. Fisher et al.⁴⁸ avancent des arguments intéressants en faveur d'un mécanisme aléatoire, reposant sur des expériences de cinétique rapide (stopped-flow) réalisées avec l'enzyme de foie de boeuf.

Cependant, l'interprétation de leurs résultats conduit à remarquer que la vitesse à laquelle l'équilibre est atteint, dépend de la grandeur relative des constantes de dissociation des substrats, qui, lorsqu'elles sont très différentes, favorisent un mécanisme de formation du complexe ternaire de type séquentiel, en raison de la fixation plus rapide du substrat dont la constante de dissociation est la plus petite. Sauf dans un cas particulier *), il est difficile

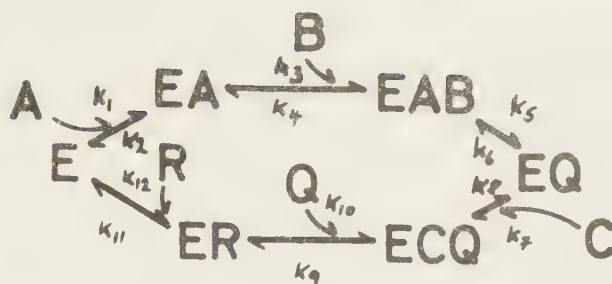
*) par exemple si le site du second substrat est superposé à celui du premier, site potentiel qui ne se réalise que lorsque le premier substrat est en place.

d'exclure un mécanisme aléatoire, car les valeurs relatives des équilibres rapides de formation des complexes font apparaître des voies préférentielles définissant ainsi un mécanisme pseudo-séquentiel.

L'enzyme du cerveau ne se distingue pas fondamentalement de l'enzyme du foie. Dans le cas présent, comme il apparaît dans les travaux de Frieden, aucune évidence de comportement allostérique ne se manifeste en première analyse dans les résultats expérimentaux du chapitre III.2. Il est donc légitime de formuler un certain nombre de mécanismes traditionnels susceptibles d'expliquer les faits expérimentaux.

Pour une réaction enzymatique à deux substrats et trois produits, le nombre de possibilités s'élève à 24, soit d'une manière générale $(n! + 2) * (m! + 2)$ où n et m représentent respectivement le nombre de substrats et de produits. Cet inventaire tient compte de la permutation de désignation des réactants, qui ne modifie en rien la formulation algébrique; aussi peut-on réduire le nombre de mécanismes à $n * m$, ici 6, à quoi s'ajoutent 2 mécanismes ping-pong et 2 mécanismes Theorell-Chance, soit au total 10.

Il faut encore compter les mécanismes allostériques qui peuvent tenir compte de la nature des interactions entre les sites des 5 réactants. Plutôt que de faire une étude systématique des modèles possibles, il est plus rationnel de déterminer un choix à priori plausible au vu des propriétés immédiatement apparentes dans les résultats expérimentaux. Pour établir ce choix à priori, il faut connaître le principe de la construction de l'équation de vitesse à partir du graphisme du mécanisme, afin de pouvoir en prédire l'allure générale. Dans ce but, nous allons développer selon la méthode de Cleland¹⁸ le mécanisme bi-uni-uni-bi-ping-pong qui peut correspondre au sens direct de la réaction catalysée par la GDH, le monomère de cette dernière étant pris comme unité active.



Ce mécanisme est décrit par les équations différentielles suivantes :

$$\frac{dE}{dt} = -k_1 * e * a + k_2 * ea + k_{11} * er - k_{12} * e * r$$

$$\frac{dEA}{dt} = k_1 * e * a + k_4 * eab - k_3 * ea * b - k_2 * ea$$

$$\frac{dEAB}{dt} = k_3 * ea * b + k_6 * eq * p - k_4 * eab - k_5 * eab$$

$$\frac{dEQ}{dt} = k_5 * eab + k_8 * ecq - k_6 * eq * p - k_7 * eq * c$$

$$\frac{dER}{dt} = k_9 * ecq + k_{12} * e * r - k_{10} * er * q - k_{11} * er$$

la condition de conservation de l'enzyme implique :

$$e_0 = e + ea + eab + eq + ecq + er$$

Dans le domaine du steady state, la concentration de chaque espèce enzymatique est constante, si bien que les différentielles ci-dessus sont toutes nulles .

La vitesse globale peut alors être définie par

$$v = k_{11} * er - k_{12} * e * r \quad \text{III.11)}$$

(pour la réaction inverse qui nous intéresse ici).

La méthode de King and Altman ⁷⁵ va nous permettre de calculer les rapports de concentration er/e_0 et e/e_0 que nous pouvons introduire dans l'expression III.11). Il est nécessaire de calculer la concentration relative de chacune des quatre espèces enzymatiques sous la forme e_i/e_0 , expressions qui comportent au dénominateur 36 termes pouvant être regroupés dans 22 expressions. Chacune de ces expressions est un produit de constantes microscopiques. Cleland ¹⁸ propose alors de définir les constantes de type Michaelis :

$$\begin{aligned}
K_A &= \frac{k_5 \cdot k_9 \cdot k_{11}}{k_1 (k_5 \cdot k_{11} + k_9 \cdot k_{11} + k_5 \cdot k_9)} \\
K_B &= \frac{k_9 \cdot k_{11} (k_4 + k_5)}{k_3 (k_5 \cdot k_{11} + k_9 \cdot k_{11} + k_5 \cdot k_9)} \\
K_C &= \frac{k_5 \cdot k_{11} (k_8 + k_9)}{k_7 (k_5 \cdot k_{11} + k_9 \cdot k_{11} + k_5 \cdot k_9)} \\
K_P &= \frac{k_2 \cdot k_8 (k_4 + k_5)}{k_6 (k_2 \cdot k_4 + k_2 \cdot k_8 + k_4 \cdot k_8)} \\
K_Q &= \frac{k_{11} (k_8 + k_9)}{k_8 \cdot k_{10}} \\
K_R &= \frac{k_2 \cdot k_4 \cdot k_8}{k_{12} (k_2 \cdot k_4 + k_2 \cdot k_8 + k_4 \cdot k_8)} \\
\frac{v}{e_o} &= \frac{k_1 \cdot k_3 \cdot k_5 \cdot k_9 \cdot k_{11} \cdot a \cdot b \cdot c - k_2 \cdot k_4 \cdot k_6 \cdot k_8 \cdot k_{10} \cdot k_{12} \cdot p \cdot q \cdot r}{D}
\end{aligned}$$

posons :

$$\begin{aligned}
N_1 &= k_1 \cdot k_3 \cdot k_5 \cdot k_7 \cdot k_9 \cdot k_{11} \cdot e_o \\
N_2 &= k_2 \cdot k_4 \cdot k_6 \cdot k_8 \cdot k_{10} \cdot k_{12} \cdot e_o \\
K_{eq} &= \frac{k_1 \cdot k_3 \cdot k_5 \cdot k_7 \cdot k_9 \cdot k_{11}}{k_2 \cdot k_4 \cdot k_6 \cdot k_8 \cdot k_{10} \cdot k_{12}}
\end{aligned}$$

Les vitesses maximales dans les deux sens de la réaction sont données par les expressions V_1 et V_2 :

$$V_1 = \frac{N_1}{\text{coefficient de } a \cdot b \cdot c} \qquad V_2 = \frac{N_2}{\text{coefficient de } p \cdot q \cdot r}$$

La vitesse globale de la réaction est la somme algébrique de ces deux vitesses :

$$v = \frac{V_1 \cdot V_2 (a \cdot b \cdot c - 1/K_{eq} \cdot p \cdot q \cdot r)}{\text{dénominateur} \cdot N_2 / \text{coefficient de } a \cdot b \cdot c \cdot \text{coefficient de } p \cdot q \cdot r}$$

Il faut aussi définir les constantes d'inhibition fonctionnelle (cf. Cleland¹⁸) pour lesquelles plusieurs possibilités existent, la meilleure étant celle qui permet une simplification maximale de la relation algébrique finale de la vitesse de réaction.

Constantes d'inhibition fonctionnelle

$$\begin{aligned}
K_{ifA} &= \frac{k_2}{k_1} & K_{ifB} &= \frac{k_4}{k_3} & K_{ifC} &= \frac{k_8}{k_7} \\
K_{ifP} &= \frac{k_5}{k_6} & K_{ifQ} &= \frac{k_9}{k_{10}} & K_{ifR} &= \frac{k_{11}}{k_{12}}
\end{aligned}$$

La vitesse globale devient :

$$v = \frac{V_1 V_2 (a*b*c - 1/Keq*p*q*r)}{D'}$$

où :

$$\begin{aligned} D' = & V_1 \{ K_R * K_Q / Keq * p + K_R / Keq * p * q + K_R * K_Q / Keq * KifR * p * r + K_P / Keq * p * r \\ & + K_R * KifP / Keq * KifA * KifB * a * b * q + K_P * KifB * KifC / KifP * KifQ * KifR * a * p * q \\ & + 1/Keq * p * q * r + K_R / KifQ * KifR * a * b * c * q + K_R * KifC / G \} \\ & + V_2 \{ K_B * KifA * c + K_C * a * b + K_B * a * c + K_C * KifB / KifP * a * p + a * b * c \\ & + K_C / KifP * a * b * p + K_A / KifQ * KifR * c * q * r + K_A / KifQ * KifR * b * c * q * r \\ & + KifC * K_A / KifQ * KifP * KifR * b * p * q * r \} \end{aligned}$$

$$\text{où } G = K_R * KifC / KifP * KifQ * KifR * a * b * p * q$$

Pour que l'expression de la vitesse soit utilisable dans l'interprétation des résultats de cinétique du steady-state il est nécessaire de lui donner la forme de l'équation de Lineweaver-Burk :

$$\frac{1}{v} = \frac{D'}{V_1 V_2 (a*b*c - 1/Keq*p*q*r)} \quad \text{III.12)}$$

Si l'on admet que les mesures expérimentales v sont les vitesses initiales (concentration quasi nulle des produits) cette équation peut être simplifiée et devient :

$$\begin{aligned} \frac{1}{v_o} = & \frac{V_1 (K_R * K_Q / Keq * p + K_R / Keq * p * q + K_Q K_R / Keq * KifR * p * r)}{V_1 V_2 / Keq * p * q * r} + \\ & \frac{V_1 (K_P / Keq * q * r + 1/Keq * p * q * r)}{V_1 V_2 / Keq * p * q * r} \end{aligned}$$

Explicitons par rapport à $1/r$:

$$\frac{1}{v_o} = \frac{1}{V_2} \left\{ 1 + K_P * \frac{1}{p} + \frac{K_R * K_Q}{KifR} * \frac{1}{q} \right\} + \frac{1}{V_2} \left\{ K_R + \frac{K_R * K_Q}{q} \right\} \quad \text{III.13)}$$

-Dans ce mécanisme , p représente l'eau (à la concentration sensiblement constante de 55M) , q figure L-Glu et r le coenzyme NAD^+ .

TABLEAU III.4.1

mécanisme	ordonnée à l'origine $1/V_m$	pente K_m/V_m
I	$\frac{1}{V_2} \left\{ 1 + K_p * \frac{1}{p} \right\}$	$\frac{1}{V_2} \left\{ K_Q + K_C * K_{ifA} * K_{ifB} * K_{eq} * V_2 * \frac{1}{p} \right\} * \frac{1}{q}$
II	$\frac{1}{V_2} \left\{ 1 + K_p * \frac{1}{p} + \frac{K_Q * K_R}{K_{ifR}} * \frac{1}{q} \right\}$	$\frac{1}{V_2} \left\{ K_R + \frac{K * K_Q}{q} \right\} * \frac{1}{r}$
III	$\frac{1}{V_2} \left\{ 1 + K_p * \frac{1}{p} + K_{ifQ} * K_p * \frac{1}{p * q} \right\}$	$\frac{1}{V_2} \left\{ K_R + K_{ifR} * K_{ifQ} * \frac{1}{q} + \frac{K_{ifA} * K_{ifB} * K_C * K_{eq} * V_2}{p * q} \right\} * \frac{1}{r}$
IV	$\frac{1}{V_2} \left\{ \frac{K_B * K_{ifA} * K_{ifC} * K_{eq}}{K_{ifQ}} * \frac{1}{p} \right\}$	$\frac{1}{V_2} \left\{ K_Q + \frac{1}{p} \right\} * \frac{1}{q}$

Explicitons par rapport à $1/q$:

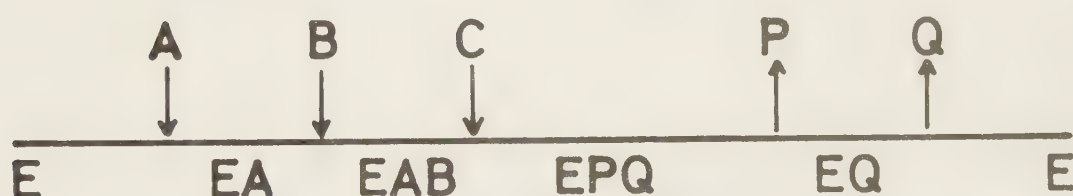
$$\frac{1}{v_o} = \frac{1}{V_2} \left\{ 1 + \frac{K_R}{r} + \frac{K_P}{p} \right\} + \frac{1}{V_2} \left\{ \frac{K_Q * K_R}{K_{ifR}} + \frac{K_Q * K_R}{r} \right\} * \frac{1}{q} \quad \text{III.14)}$$

Ces équations sont à mettre en parallèle avec l'équation III.15) :

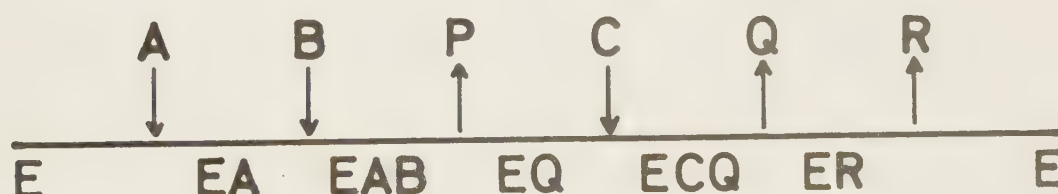
$$\frac{1}{v_o} = \left(\frac{1}{VM} \right)_{\text{apparent}} + \left(\frac{KM}{VM} \right)_{\text{apparent}} * \frac{1}{S} \quad \text{III.15)}$$

Les expressions de la pente et de l'ordonnée à l'origine sont les mêmes que r ou q soit mis en évidence, c'est-à-dire une droite en fonction du substrat variable, Par conséquent un tel mécanisme ne peut expliquer la courbure des graphes de second ordre (Fig. 19 et 20).

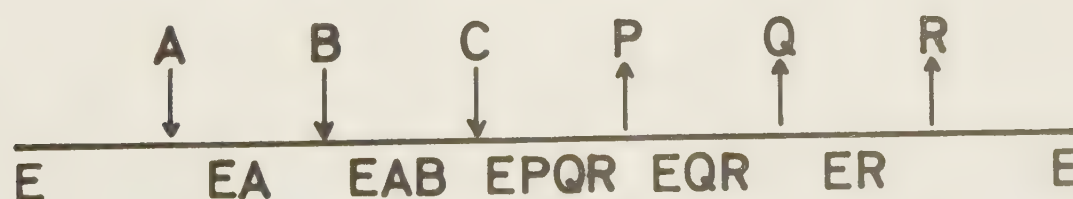
I. ter - bi



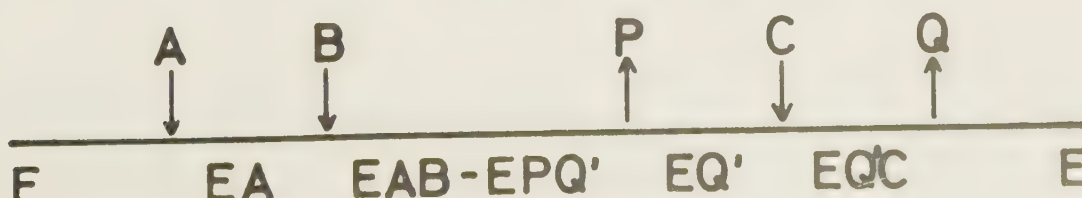
II. bi - uni - uni - bi ping - pong



III. ter - ter



IV. bi - uni - uni - uni ping - pong

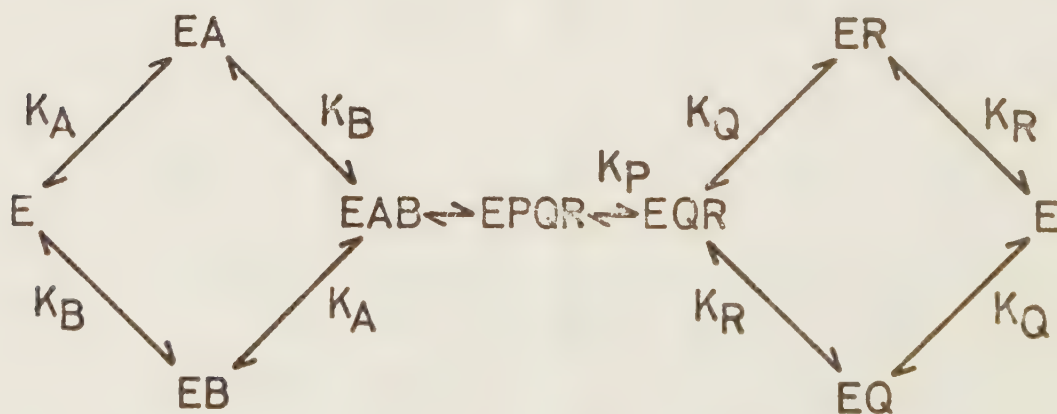


Les schémas linéaires ci-dessus, représentent les 4 mécanismes calculés par la méthode de Cleland, dont les paramètres sont réunis dans le tableau III.4.1.

Le développement du mécanisme II permet de voir la construction de l'expression d'un mécanisme séquentiel quelconque. Ainsi, pour tout mécanisme séquentiel ne faisant intervenir qu'un seul site par substrat (réactant), les expressions de la pente et de l'ordonnée à l'origine seront du premier degré en $1/S$ et par conséquent, ne rendent pas compte de la courbure des graphes de second ordre.

Pour le calcul des mécanismes aléatoires, nous avons préféré utiliser la méthode des équilibres rapides de Sungman Cha¹³¹ car elle donne des développements algébriques moins compliqués. Elle repose sur l'hypothèse de la formation rapide des complexes enzyme-substrat.

Dans le cas de la GDH, il y a deux substrats dans le sens inverse (que nous étudions ici) et trois produits. Hochreiter & Schellenberg⁶⁷ montrent que la réaction directe peut se dérouler sans NADH jusqu'au stade de complexe ternaire E-NH₃-2-oxo-glutarate. Cela définit deux étapes aléatoires dans ce mécanisme, l'une intéressant les deux substrats A et B, l'autre les produits Q et R.



Il y a huit états de l'enzyme parmi lesquels nous prendrons E comme référence. La concentration relative de ces huit états peut être calculée comme suit :

$$f_{Ei} = \frac{E_i}{E + EA + EB + EAB + ER + EQ + EPQR}$$

Si la transition entre EAB et EPQR est l'étape limitante, alors la vitesse de la réaction est donnée par :

$$V = (k_1 * EAB - k_2 * EPQR) E_0 \quad \text{III.16 a)}$$

$$V = \frac{\frac{k_1 * A * B}{K_A * K_B} - \frac{k_2 * P * Q * R}{K_P * K_Q * K_R}}{D} \quad \text{III.16 b)}$$

$$D = 1 + \frac{A}{K_A} + \frac{B}{K_B} + \frac{A * B}{K_A * K_B} + \frac{R}{K_R} + \frac{Q * R}{K_Q * K_R} + \frac{P * Q * R}{K_Q * K_P * K_R}$$

Au temps $t = 0$, P, Q, et R sont sensiblement nuls. Par conséquent l'inverse de la vitesse initiale est donnée par :

$$\frac{E_0}{v_0} = \frac{1 + A/K_A + B/K_B + A * B / K_A * K_B}{A * B * k_1 / K_A * K_B} \quad \text{III.17)}$$

L'équation III.17) montre que, soit en fonction de A, soit de B, les graphes de second ordre, pente et ordonnée à l'origine sont de forme linéaire. Mais pour cette résolution nous avons postulé que P, Q et R sont sensiblement nuls. Peut-être ces concentrations sont-elles suffisamment grandes pour modifier les expressions ci-dessus, soit au temps t de la réaction :

$$\begin{aligned} A(t) &= A_0 - x(t) \\ B(t) &= B_0 - x(t) \end{aligned} \quad \text{III.18)}$$

Comme $P_0 = Q_0 = R_0 = 0$ alors

$$P(t) = Q(t) = R(t) = x(t)$$

Introduisons ces expressions dans III.17) :

$$\frac{E_0}{v_0} = \frac{1 + \frac{A-x(t)}{K_A} + \frac{B-x(t)}{K_B} + \frac{(A-x(t))(B-x(t))}{K_A * K_B} + \frac{x(t)}{K_Q} + \frac{x(t)}{K_R} + \frac{x(t)^2}{K_Q * K_R} + \frac{x(t)^3}{K_Q * K_R * K_P}}{k_1 \frac{(A-x(t))(B-x(t))}{K_A * K_B} - k_2 \frac{x(t)^3}{K_P * K_Q * K_R}} \quad \text{III.19)}$$

Lorsque l'équilibre dynamique du steady-state est atteint, $x(t) = x \neq 0$. Selon le rapport x/K_i ($i = A, B, P, Q, R$) il est possible de négliger les termes en $x(t)$ vis-à-vis de A et B (dans l'équation ci-avant III.19), si bien que l'expression redevient de type classique linéaire par rapport à la réciproque des substrats. Sinon, le maintien de $x(t)$, qui est une fonction de A_0 et B_0 , introduit une déviation par rapport à la droite attendue, de type inhibition par les produits.

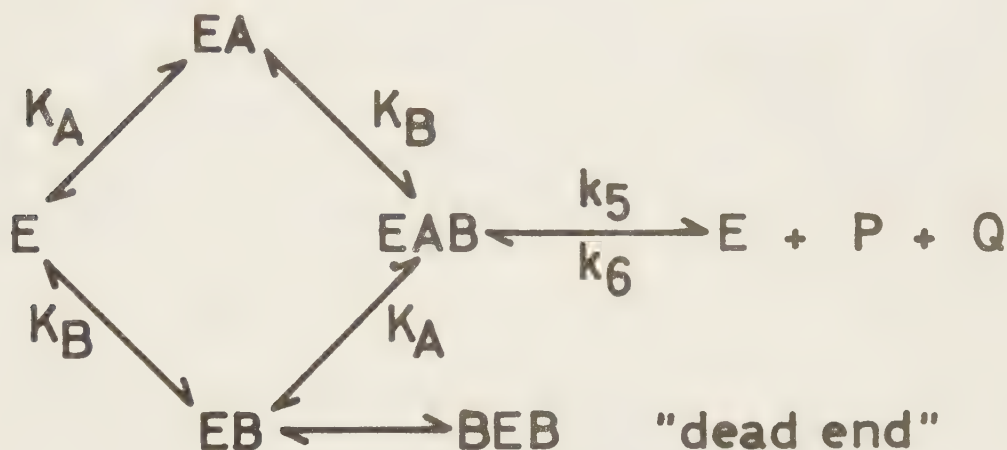
Les graphes de second ordre ne sont pas seuls modifiés. Une déviation semblable devrait être observée dans les graphes de Lineweaver-Burk.

Malheureusement, l'équation III.19) n'est utilisable que dans la mesure où elle représente exactement le mécanisme réel. De plus, l'ajustement des valeurs expérimentales nécessite un temps de calcul très long, de plusieurs minutes par couple de valeurs V_0/S sur l'ordinateur CDC 3800.

Ces inconvénients soulignent l'intérêt pratique des méthodes traditionnelles. Ainsi, la courbure des graphes de la Fig. 19 peut être attribuée à une inhibition par le substrat, phénomène observé dans les graphes double-réciproque dès la concentration de 200 mM en L-Glu, inhibition dont un modèle est donné ci-après.

III.4.2. Inhibition par excès de substrat

Parmi les différents mécanismes d'inhibition par excès de substrat, celui faisant état d'un complexe ternaire stérile avec deux molécules de L-Glu paraît être le plus vraisemblable (L-Glu = B dans le schéma ci-dessous)



Le développement selon la méthode de Sungman Cha¹³¹ conduit à l'expression suivante de la réciproque de la vitesse pour la réaction de gauche à droite :

$$\frac{1}{v_o} = \frac{1}{V} + \frac{K_A}{V} * \frac{1}{A} + \frac{K_B}{V} * \frac{1}{B} + \frac{K_A * K_B}{V} * \frac{1}{A} * \frac{1}{B} + \frac{K_A}{V * K} * \frac{B}{A}$$

La pente du diagramme de Lineweaver-Burk correspondant en fonction de $1/A$ est :

$$\frac{K_m}{V_m} = \frac{K_A}{V} + \frac{K_A * K_B}{V} * \frac{1}{B} + \frac{K_A}{V * K} * B$$

Cette expression est de forme parabolique (analogue à celle proposée par Barton et al.⁶) et fait état de l'existence d'un second site à L-Glu, site non catalytique, qui nous le verrons plus loin, est aussi invoquée dans l'explication de l'inhibition par l'acide D-glutamique.

Dans l'expression de $1/v_o$ la contribution du terme en B n'est perceptible que pour des valeurs relativement grandes de la concentration en B, ce qui permet d'observer des graphes de Lineweaver-Burk linéaires dans le domaine de concentration en glutamate allant de 1 mM à 150 mM.

III.4.3. Activation par NAD^+ : interaction homotropique coopérative négative

Le graphe réciproque de $1/v_0$ versus $1/\text{NAD}$ (figure 21a) présente une courbe à transitions brusques définissant plusieurs zones pseudo-linéaires (cf. III.2) dont deux sont particulièrement visibles dans le domaine des concentrations en NAD utilisées ici. C'est ce phénomène qui nous oblige à séparer l'ensemble des mesures faites, en deux groupes distincts (Fig. 16 et 17), correspondant à des constantes de Michaelis différentes et à des vitesses maximales qui sont dans un rapport de 1 à 2.78 (cf. TABLEAU III.2.2).

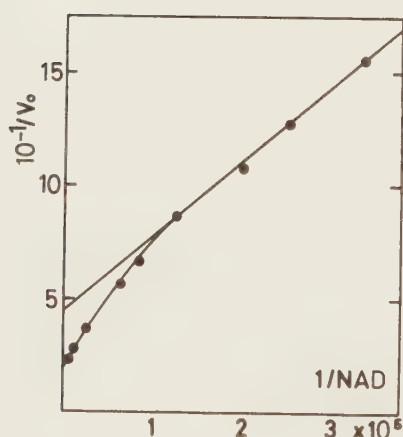


Fig. 21a Activation par NAD. Graphe double réciproque. Concentration en L-Glu : 120 mM. Les autres conditions figurent dans le texte (cf. III.1.3.2)

Les diagrammes de Hill, $\ln(v_0/V-v_0)$ versus $\ln(\text{NAD})$ conduisent de même (TABLEAU III.4.3.1) à deux constantes-limite de dissociation (L-Glu en concentration infinie) de 5×10^{-6} et 2.8×10^{-5} (Fig. 22 et 23). Ceci montre l'existence de deux sites à NAD, dont le premier est catalytique alors que le second est soit un site modulateur, soit le site catalytique d'un second protomère dont l'affinité pour le substrat serait moins grande. Cette hypothèse des sites catalytiques multiples

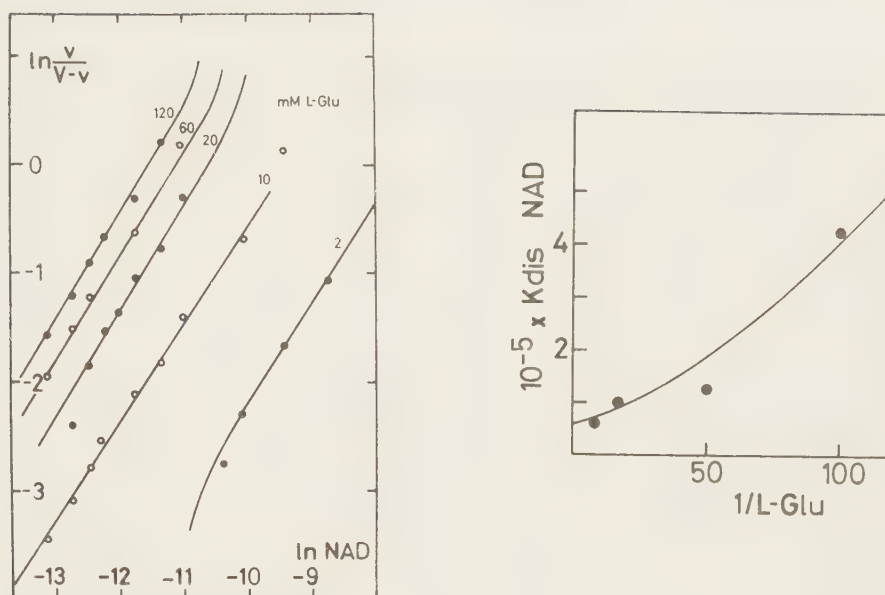


Fig. 22 Diagramme de Hill des données de la figure 16 (à gauche).
 Graphe des constantes de dissociation de NAD en fonction de $1/\text{L-Glu}$.
 (à droite). Les constantes de dissociations sont celles définies
 dans la figure de gauche.

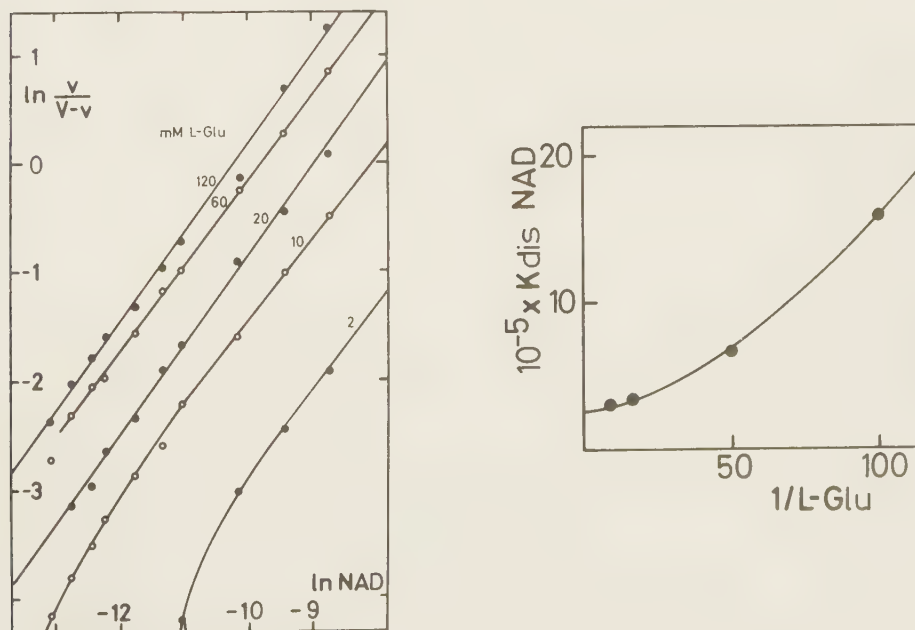


Fig. 23 Diagramme de Hill des données de la figure 17 (à gauche).
 Graphes des constantes de dissociation de NAD en fonction de $1/\text{L-Glu}$.
 (à droite). Les constantes sont celles définies dans la figure de
 gauche soit dans des conditions de saturation en NAD.

TABLEAU III.4.3.1

Coefficient de Hill et constante de dissociation de NAD

$\ln \left\{ \frac{V}{V - v} \right\} = n_H \ln(\text{NAD}) + \ln \left\{ \frac{1}{K_{\text{diss}}^{\text{NAD}}} \right\}$			V est ici la vitesse maximale définie par L-B
Concentrations en NAD < 10 µM			a)
L-Glu mM	$K_{\text{diss}}^{\text{NAD}}$	n_H	
10	$4.246 * 10^{-5}$	1.006	
20	$1.230 * 10^{-5}$	1.028	
60	$9.914 * 10^{-6}$	1.006	
120	$5.963 * 10^{-6}$	1.015	
Concentrations en NAD > 10 µM			b)
10	$1.587 * 10^{-4}$	0.950	
20	$6.746 * 10^{-5}$	0.978	
60	$3.557 * 10^{-5}$	0.993	
120	$3.279 * 10^{-5}$	0.991	

L'extrapolation à L-Glu $\rightarrow \alpha$ donne les constantes de dissociation suivantes :

$$K_I = 5 * 10^{-6} \quad K_{II} = 2.8 * 10^{-5}$$

Si l'on prend pour V les vitesses maximales définies par les graphes de second ordre (Fig. 19 et 20), les valeurs suivantes des coefficients de Hill et des constantes de dissociation sont obtenues.

Vmax = 0.02055		$K_{\text{diss}}^{\text{NAD}} \text{ limite} = 2.50 * 10^{-6}$
10	$5.60 * 10^{-5}$	1.06
20	$1.09 * 10^{-5}$	1.23
60	$6.93 * 10^{-6}$	1.22
120	$3.02 * 10^{-6}$	1.40
Vmax = 0.05710		$K_{\text{diss}}^{\text{NAD}} \text{ limite} = 2.80 * 10^{-4}$
10	$2.70 * 10^{-3}$	0.74
20	$8.34 * 10^{-4}$	0.80
60	$5.44 * 10^{-4}$	0.77
120	$3.30 * 10^{-4}$	0.79

TABLEAU III.4.3.2

Coefficient de Hill et constante de dissociation de L-Glu

Vmax utilisé ici est celui déterminé par les graphes L-B (Fig. 18)

NAD μ M	Kdiss ^{L-Glu}	n _H
3	5.956 * 10 ⁻²	1.029
5	5.808 * 10 ⁻²	0.993
8	4.313 * 10 ⁻²	1.007
12	3.372 * 10 ⁻²	1.035
16	3.222 * 10 ⁻²	0.999
40	2.287 * 10 ⁻²	1.011
80	1.900 * 10 ⁻²	1.008
160	1.257 * 10 ⁻²	1.010

L'extrapolation à NAD $\rightarrow \infty$ définit la constante limite :

$$K^{\text{L-Glu}} = 6.08 * 10^{-3}$$

TABLEAU III.4.3.3

Paramètres des équations III.21) et III.22) estimés à l'aide du programme MALIK

L-Glu mM	A	B	C	D
60	$1.37 * 10^5$	$1.63 * 10^9$	$2.02 * 10^3$	$8.38 * 10^7$
120	$1.74 * 10^5$	$1.31 * 10^9$	$3.00 * 10^3$	$9.20 * 10^7$
*)	$2.07 * 10^5$	$1.02 * 10^9$	$3.94 * 10^3$	$1.02 * 10^8$

*) Extrapolation linéaire des paramètres en fonction de 1/L-Glu pour
L-Glu $\rightarrow \infty$

Remarque : l'estimation des paramètres ci-dessus comporte une incertitude non négligeable provenant du nombre de données insuffisantes pour l'utilisation du programme Malik.

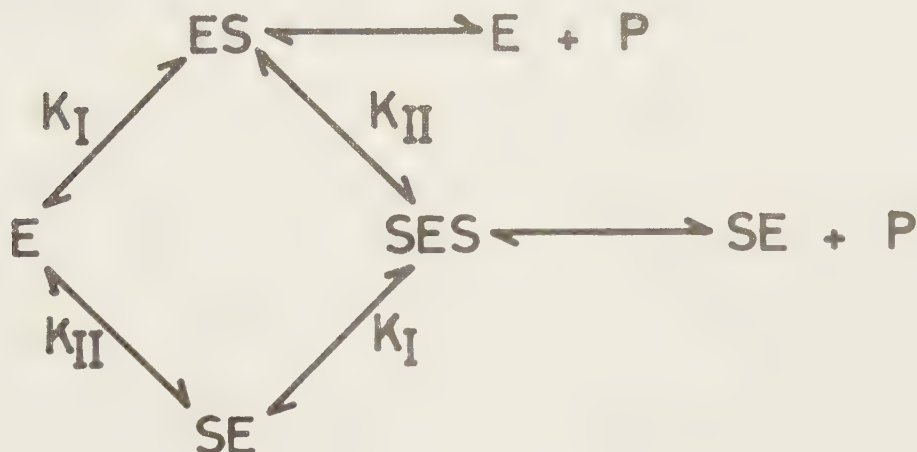
Calcul des constantes de dissociation à partir des coefficients A, B, C et D calculés ci-dessus à l'aide des expressions ci-dessous tirées des équations III.21) et III.22).

paramètre	modèle III.21)	modèle III.22)
A	$1/K_I + 1/K_{II}$	$1/K_I$
B	$1/K_I * K_{II}$	$1/K_I * K_{II}$
C	V/K_I	V/K_I
D	$V'/K_I * K_{II}$	$V'/K_I * K_{II}$
60 mM L-Glu :	$K_I = 8.075 * 10^{-6}$ $K_{II} = 7.597 * 10^{-4}$ $V = 0.0163$ $V' = 0.0514$	$K_I = 7.299 * 10^{-6}$ $K_{II} = 8.405 * 10^{-5}$ $V = 0.0147$ $V' = 0.0514$
120 mM L-Glu :	$K_I = 6.020 * 10^{-6}$ $K_{II} = 1.27 * 10^{-4}$ $V = 0.01806$ $V' = 0.07023$	$K_I = 5.747 * 10^{-6}$ $K_{II} = 1.328 * 10^{-4}$ $V = 0.01724$ $V' = 0.07023$
L-Glu $\rightarrow \infty$	$K_I = 4.951 * 10^{-6}$ $K_{II} = 1.980 * 10^{-4}$ $V = 0.0195$ $V' = 0.100$	$K_I = 4.830 * 10^{-6}$ $K_{II} = 2.029 * 10^{-4}$ $V = 0.01903$

ne peut être exclue bien que le coefficient de Hill, n_H , reste voisin de l'unité dans tous les cas décrits ici.

Il en résulte deux modèles.

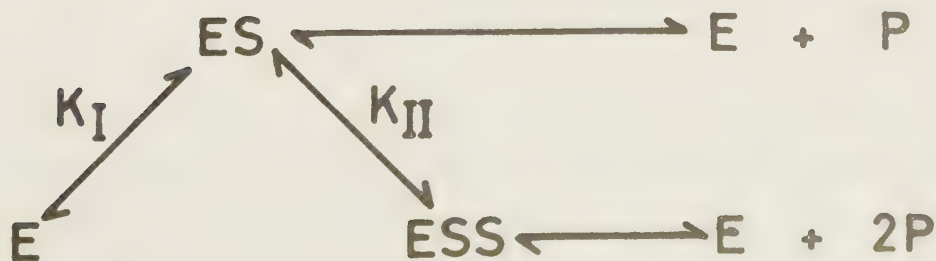
a) L'activation est due à l'effet d'un site modulateur à NAD :



L'application de la méthode de calcul des équilibres rapides¹³¹ donne l'expression suivante pour la réciproque de la vitesse initiale :

$$\frac{1}{v_0} = \frac{\frac{1}{S^2} + \left(\frac{1}{K_I} + \frac{1}{K_{II}} \right) * \frac{1}{S} + \frac{1}{K_I * K_{II}}}{\frac{V}{K_I} * \frac{1}{S} + \frac{V'}{K_I * K_{II}}} \quad \text{III.2.1) }$$

b) Dans l'hexamère, chaque protomère fonctionne individuellement, agit sur son plus proche voisin en réduisant son affinité pour NAD :



$$\frac{1}{v_o} = \frac{\frac{1}{S^2} + \frac{1}{K_I} * \frac{1}{S} + \frac{1}{K_I * K_{II}}}{\frac{V}{K_I} * \frac{1}{S} + \frac{V'}{K_I * K_{II}}} \tag{III.22}$$

La forme de cette équation est la même que celle de III.21). Il est par conséquent possible d'ajuster l'expression III.23) aux valeurs expérimentales des figures 16 et 17 réunies.

$$y = \frac{x^2 + Ax + B}{Cx + D} \tag{III.23}$$

Cet ajustement est réalisé à l'aide du programme MALIK écrit en langage FORTRAN (sur ordinateur CDC 3800), programme qui calcule la fonction de vraisemblance maximale (maximal likelihood-function) et fournit les paramètres A, B, C et D lorsque cette fonction est optimisée. Le tableau III.4.3.3. donne les valeurs de A,B, C et D ainsi calculées pour les concentrations en glutamate de 20, 60 et 120 mM. La comparaison des deux modèles avec les constantes déterminées par les "Hill plots" est donnée dans le même tableau.

La correspondance entre les vitesses maximales V et V' déterminées par cette méthode et celle définie par les graphes d'ordre deux (Fig. 19 et 20) n'est pas parfaite.

	MALIK	Lineweaver-Burk
V	0.0193	0.02055
V'	0.1000	0.05710

Si l'on recalcule les paramètres A et B à l'aide de C et D déterminés par MALIK, et avec les vitesses maximales de la colonne de droite, il apparaît que les différences avec les paramètres A et B tirés de MALIK ne sont pas significatives. Autrement dit, les paramètres A, B, C et D ne sont pas connus avec une précision suffisante pour permettre une distinction entre les deux modèles proposés plus haut.

Il y a un parallèle certain entre le comportement cinétique et les propriétés de la structure quaternaire de GDH telles qu'elles sont décrites au chapitre II.4. En effet, l'hexamère possède une configuration qui implique l'existence de deux types de liaisons inter-protomères (d'un point de vue purement géométrique) :

- 1^o) Les liaisons entre protomères d'un même plan (plan défini par les trois sous-unités supérieures ou inférieures) soit six liaisons.
- 2^o) Les liaisons entre sous-unités appartenant aux deux plans et situées l'une au-dessous de l'autre, soit trois liaisons.

A ces remarques spéculatives s'ajoute une observation, dont l'explication demeure obscure en attendant une étude plus complète du phénomène, montrant que ces deux types de liaisons ne sont pas équivalentes par leur stabilité, puisque l'amine quaternaire Chlorure de Zephiran *) dissocie GDH en dimères de 115 000 daltons (cf. Tableau II.1). De même, les préparations de l'enzyme pour la microscopie électronique contiennent un nombre non négligeable de tels dimères (Fig. 11 et 12).

Discussion

Déjà observée par Olson & Anfinsen¹⁰³, l'activation par NAD est expliquée par Frieden⁵⁰⁻⁵² par l'expression ci-dessous :

$$\frac{1}{v_o} = \frac{1 + \frac{NAD}{K_I} + \frac{K_{II}}{NAD}}{V \left(1 + \frac{V'}{V * K_{II}} * NAD\right)} \quad A)$$

Dans un tampon Tris-acétate pH 8.0, une concentration en L-glutamate de 50 mM, les constantes ont les valeurs suivantes:

$$K_I = 1.4 \times 10^{-5} \quad K_{II} = 2.5 \times 10^{-4} \quad \frac{V'}{V} = 3.0$$

*) Chlorure de Zephiran : $\left\{ \underset{I}{\text{R-N}} \overset{I}{\phi} \right\}^+ \text{Cl}^-$

L'équation de Frieden est très proche de III.22) proposée dans ce travail, mais il y a une certaine divergence dans les déterminations des constantes de dissociation.

Dalziel & Engel^{27 40} proposent à la suite des travaux de Monod et al.¹⁰⁰ et de Koshland et al.⁷⁷ une explication par un effet allostérique homotropique négatif intéressant deux sites catalytiques homologues de l'enzyme. L'équation proposée par ces auteurs

$$\frac{1}{v_o} = \frac{c + dS + eS^2}{aS + bS^2} \quad \text{B)}$$

donne une corrélation satisfaisante avec les valeurs expérimentales. Aussi bien un modèle d'Adair^{1 2} qu'un modèle concerté de Monod¹⁰⁰ peut être exprimé sous cette forme. Engel reprend avec un collaborateur⁴² cette expression et la développe en faisant intervenir plus de deux sites catalytiques, ce qui correspond mieux aux connaissances actuelles de la structure quaternaire de l'enzyme qui possède 6 sites catalytiques par unité active³⁵ (8 sites pour un PM de 400 000⁵⁹). Toutefois nous préférons dans ce travail nous en tenir au modèle plus simple des équations III.21) et III.22), car la méthode du steady state ne permet pas une estimation de toutes les constantes de dissociation individuelles. Pour des raisons de symétrie de l'unité active, et de l'identité des 6 chaînes peptidiques³, le modèle de type "induced fit"⁷⁷ représente la plus séduisante explication du phénomène:

à l'intérieur de la paire de sous-unités intéressées par le couplage allostérique, l'occupation du premier site est aléatoire et provoque la transconformation responsable de la diminution de l'affinité du second site (modèle B ci-dessus).

L'information recueillie ne permet pas d'étendre le modèle aux six protomères de l'unité active, mais tout se passe comme si les six sous-unités étaient disposées en trois paires, celles-ci travaillant indépendamment les unes des autres.

III.4.4. Inhibition par l'acide D-glutamique

Les graphes double-réciproque (Lineweaver-Burk) pour diverses concentrations en inhibiteur sont typiquement ceux d'une inhibition compétitive ; l'ordonnée à l'origine ne dépend pas de la concentration en D-Glu. Le graphe des pentes en fonction de la concentration en inhibiteur (Fig. 27) ne définit pas une droite comme dans l'inhibition compétitive traditionnelle, mais une courbe hyperbolique qui caractérise selon Cleland (in "The Enzymes" Boyer éditeur. Vol II. (1970), les inhibitions compétitives hyperboliques. Dans ce type d'inhibition, le graphe de Dixon ($1/v$ versus I) n'est pas linéaire, ce qui apparaît clairement dans la figure 24 . Dans celle-ci, la constante d'inhibition K_i est définie par l'intersection des courbes correspondant à plusieurs concentrations du substrat.

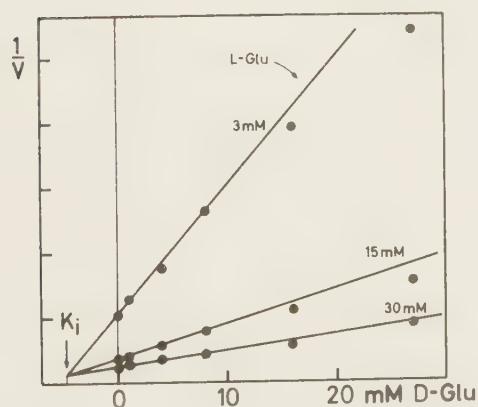


Fig. 24 Inhibition par l'acide D-glutamique. Graphe de Dixon pour 3 concentrations en L-Glu. Conditions expérimentales dans le texte.

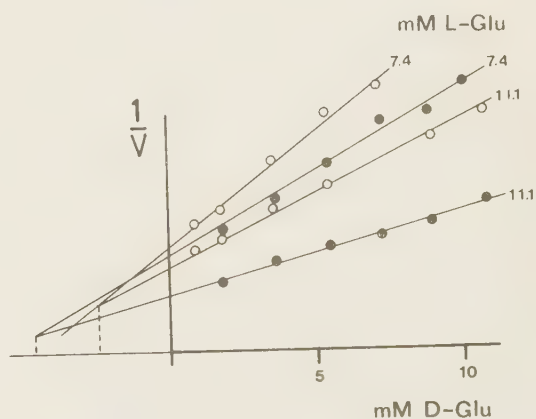


Fig. 25 Inhibition par l'acide D-glutamique. Graphe de Dixon pour 2 concentrations du substrat (7.4 et 11.1 mM) et deux pH différents : -O- , pH 7.6 et -●- , pH 9.0 .

La constante d'inhibition est essentiellement dépendante du pH comme le montre le tableau III.4.4 qui réunit les constantes d'inhibition définies par les figures 24 et 25.

TABLEAU III.4.4

Inhibition par l'acide D-glutamique
Constante d'inhibition en fonction du pH

pH	K_i en mM
7.50	4.65
7.60	4.55
8.80	4.13
9.00	5.93

Les constantes d'inhibition passent par un minimum au voi-
sinage du pH optimum de la réaction, soit entre pH 8.5 et 8.8 .

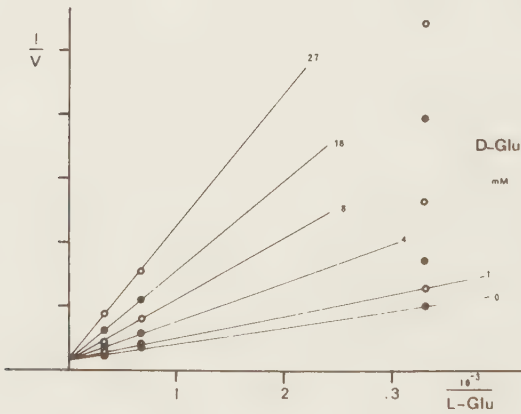


Fig. 26 Inhibition compétitive par l'acide D-glutamique.
Graphe double réciproque pour 5 concentrations en inhibi-
teur. Conditions expérimentales dans le texte.

L'expression la plus simple d'une inhibition compétitive est
donnée par l'expression :

$$\frac{1}{v_o} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} * \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) * \frac{1}{S}$$

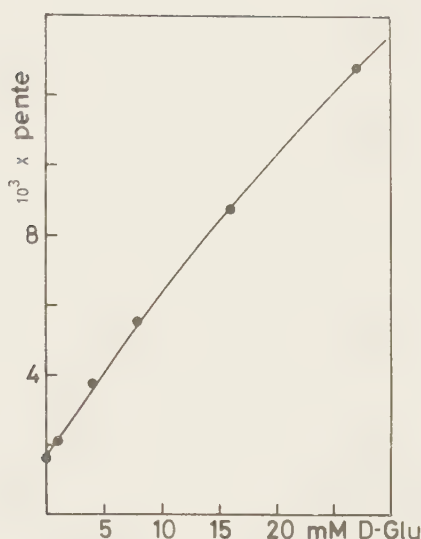
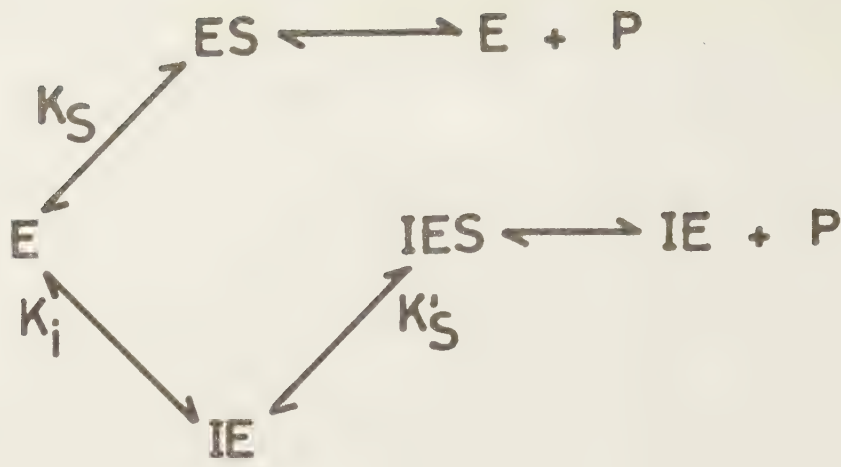


Fig. 27 Inhibition compétitive hyperbolique par l'acide D-glutamique. Graphe des pentes de la figure 26 en fonction de la concentration en D-glutamate. Le trait plein est la représentation graphique de l'équation III.25) (tracée par un ordinateur de table Wang 700).

Cette équation ne traduit pas le comportement hyperbolique du "Dixon plot", comportement qui nécessite l'intervention d'un site à inhibiteur indépendant du site catalytique, c'est-à-dire que le complexe enzyme-inhibiteur peut être actif. L'inhibiteur, dans le modèle classique de l'inhibition compétitive hyperbolique ne modifie pas la vitesse maximale de la réaction, mais l'affinité de l'enzyme pour le substrat, ce qui se traduit par le modèle suivant :



L'expression de la réciproque de la vitesse initiale de ce modèle est :

$$\frac{1}{v_o} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}} * \frac{K_S (1 + \frac{I}{K_i})}{1 + \frac{I * K_S}{K_i * K_S}} * \frac{1}{S}$$

III.24)

La pente en fonction de la concentration de l'inhibiteur est de la forme :

$$\text{pente} = \frac{A + \frac{B * I}{C + D * I}}{\quad} \quad \text{III.25)}$$

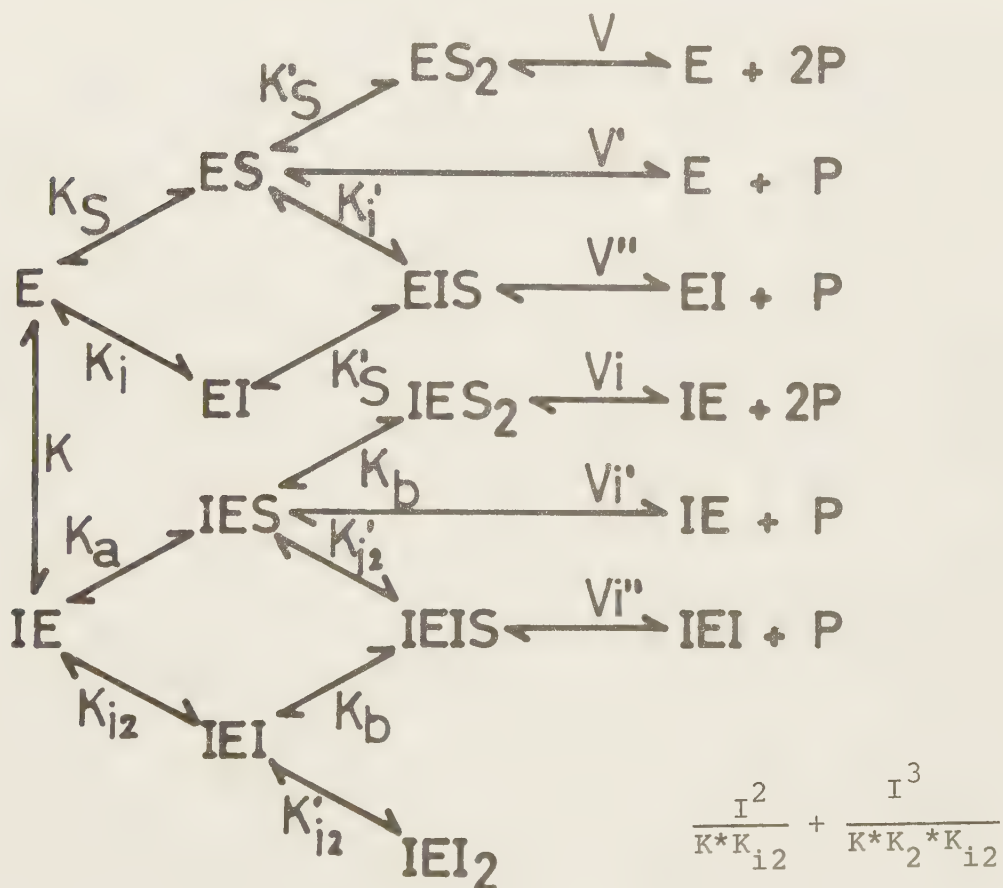
Les coefficients A, B, C, D calculés sur la base des valeurs expérimentales sont réunis ci-dessous :

coefficient	forme algébrique	valeur expérim.	constantes cin.
A	1	1	
B	1/K _i	335.093	K _i = 2.98 * 10 ⁻³
C	Vmax/K _S	6.257*10 ⁻²	K _S = 1.54 * 10 ⁻³
D	Vmax/K _i *K' _S	6.211*10 ⁻²	K' _S = 5.21 * 10 ⁻²

Dans l'inhibition compétitive hyperbolique, le complexe EI n'est pas formé (I ne se fixe pas sur le site catalytique) mais IE, où I se fixe sur un site modulateur qui modifie l'affinité de l'enzyme pour le substrat sans altérer la vitesse maximale de la réaction.

Ce modèle est une approximation, car il n'explique pas la courbure du graphe double réciproque de la figure 26 . Mais l'ensemble des données recueillies ne permet pas de tirer de conclusions plus précises. En fait les pentes uti-

lisées dans l'établissement de la figure 27 sont estimées au voisinage de l'origine des graphes double-réciproque, par conséquent dans un domaine de saturation en L-Glu (substrat) très défavorable à la fixation de l'inhibiteur sur le site catalytique. Par conséquent, l'effet encore perceptible dans ces conditions est celui du site modulateur. Le mécanisme global doit être mieux décrit par le schéma suivant et l'équation III.26) .



$$\frac{1}{v_0} = \frac{\frac{S}{K_S} + \frac{S^2}{K_S * K'_S} + \frac{S * I}{K_S * K'_i} + \frac{S * I}{K_a * K} + \frac{S * I^2}{K_b * K * K_{i2}} + \frac{S^2 * I}{K_a * K_b} + \frac{I}{K_i} + \frac{I^2}{K * K_{i2}} + \frac{I^3}{K * K_2 * K_{i2}}}{\frac{V * S^2}{K_S * K'} + \frac{V' * S}{K_S} + \frac{V'' * S * I}{K_S * K_i} + \frac{V_2 * S^2 * I}{K_a * K_b * K} + \frac{V_i' * S * I}{K_a * K_i} + \frac{V_i'' * S * I^2}{K_b * K * K_{i2}}}$$

III.26)

Comme la fixation de l'inhibiteur sur le site modulateur ne modifie pas sensiblement la constante catalytique, il faut admettre que les vitesses V et V_i sont sensiblement

égales. On ne peut rien affirmer au sujet de V'_i et de V''_i , mais il est raisonnable de poser de même :

$$V' = V'_i \quad \text{et} \quad V'' = V''_i$$

La réciproque de la vitesse devient :

$$\frac{1}{v_o} = \frac{1 + S\left\{\frac{1}{K_S} + \frac{I}{K_S * K'_i} + \frac{I}{K_a * K} + \frac{I^2}{K_b * K * K_{i2}}\right\} + S^2\left\{\frac{1}{K_S * K'_i} + \frac{I}{K_a * K_b * K}\right\} + I\left\{\frac{1}{K_i} + \frac{1}{K}\right\} + \frac{I^2}{K * K_{i2}} + \frac{I^3}{K * K_{i2} * K'_{i2}}}{V\left\{\frac{S^2}{K_S * K'_i} + \frac{S^2 * I}{K_a * K_b * K}\right\} + V'\left\{\frac{S}{K_S} + \frac{S * I}{K_a * K_i}\right\} + V''\left\{\frac{S * I}{K_S * K_i} + \frac{S * I^2}{K_b * K * K_{i2}}\right\}}$$

III.27)

Ce modèle tient compte de l'interaction entre les sites catalytiques appartenant à deux sous-unités protéiques voisines, interaction qui a été mise en évidence dans l'étude de l'activation par NAD.

Dans cette équation, le nombre de paramètres est trop élevé pour que l'on puisse déterminer chacun d'eux. Mais il est évident que dès que la concentration en substrat (L-Glu) est supérieure à 10 mM, les complexes de type EI ne se forment pratiquement plus et seul le site modulateur intervient. Cela signifie que la constante de dissociation au niveau de ce site est beaucoup plus petite que celle du complexe EI de l'inhibiteur sur le site catalytique.

La constante $K_i = 2.98$ mM déterminée par la figure 27 et l'équation III.25) correspond à la dissociation du complexe IE. Par contre, les K_i du tableau III.4.4) sont des constantes mixtes se rapportant à IE et à EI, puisqu'elles ont été déterminées par le diagramme de Dixon avec deux concentrations relativement faibles de L-Glu, soit 7.4 mM et 11.1 mM, ce qui explique la différence observée d'avec la valeur de 2.98 mM.

Cette expérience met en évidence un site modulateur capable de fixer un acide aminé, sans spécificité absolue quant à la configuration du carbone asymétrique. Vraisemblablement ce site est-il aussi responsable de l'inhibition par excès de substrat observée à des concentrations en L-Glu supérieures à 250 mM.

III.4.5. Activation par les AMP

Deux isomères de l'AMP sont étudiés ici. Les figure 28 et 29 montrent l'activation par 2'-3'AMP et 5'-AMP de la réaction de déamination de l'acide glutamique, réaction inverse, respectivement par 5'AMP de la réaction directe, sous la forme des graphes de Lineweaver-Burk. Les K_m , V_m , n_H et constantes de dissociation sont rappelées dans le tableau III.4.5.1 .

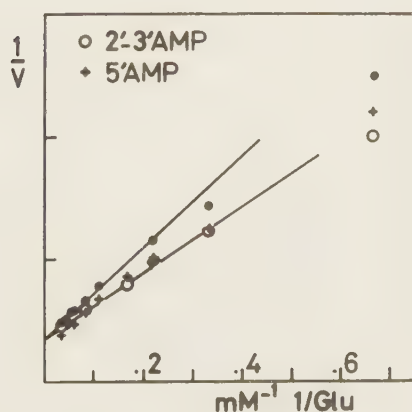


Fig. 28 Graphe double réciproque de l'activation par 2'-3'AMP (-O-) et 5'AMP (-+-) . Témoin : -●- .
-O- : 2.7 mM 2'-3'AMP, -+- : 2.56 mM 5'AMP.

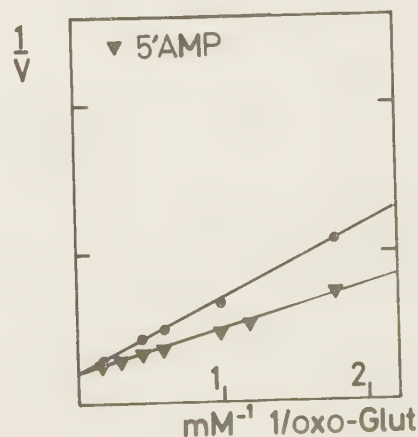


Fig. 29 Graphe double réciproque de l'activation par 5'AMP de la réaction directe en fonction de la concentration en 2-oxo-glutarate.
-●- : témoins, -▲- : 2.6 mM 5'AMP.

Le nucléotide cyclique n'agit pas sur la constante catalytique mais augmente l'affinité pour le substrat (ici le substrat explicite est L-Glu) mais l'effet doit aussi se reporter

TABLEAU III.4.5.1

Action des AMP sur les paramètres cinétiques

nucléoside	mM	Km * 10 ³	Vm	n _H	Kdiss apparente	substrat	
TEMOIN	—	1.500	0.060	0.5224	0.0096	1.004	2-oxo-glutarate
5'AMP	2.7	2.730	0.130	0.5314	0.0126	0.997	
TEMOIN	—	9.519	0.760	0.2705	0.0089	0.967	L-glutamate
2'-3'AMP	2.7	6.986	0.580	0.2742	0.0078	0.994	
TEMOIN	—	12.660	1.200	0.3786	0.0164	0.957	L-glutamate
5'AMP	2.56	9.519	0.760	0.2705	0.0089	0.967	

sur les autres réactants) alors que l'action de 5'AMP semble plus complexe, puisqu'il agit à la fois sur V_m et sur K_m , et de plus, augmente la constante de dissociation apparente.

La réaction directe (amination de 2-oxo-glutarate) n'est pas affectée de la même manière par AMP, puisque seul le K_m est modifié et c'est la constante de dissociation apparente qui diminue d'un facteur 2.

L'interaction complexe entre AMP et GDH apparaît encore plus clairement dans la figure 30 où AMP est pris comme variable en abscisses. Tout d'abord il faut constater une inhibition par excès de NADH puisque la vitesse de la réaction est plus élevée avec une concentration de $34 \mu\text{M}$ en NADH qu'avec $340 \mu\text{M}$.

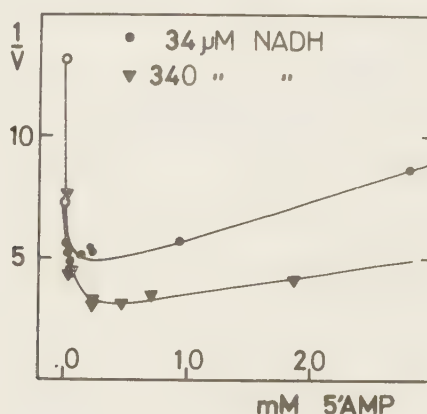


Fig. 30 Activation par 5'AMP de la réaction directe. Réciproque de la vitesse initiale en fonction de la concentration en 5'AMP. —●— : $34 \mu\text{M}$ NADH, —▼— $340 \mu\text{M}$ NADH. Autres conditions dans le texte.

Deux effets peuvent être distingués :

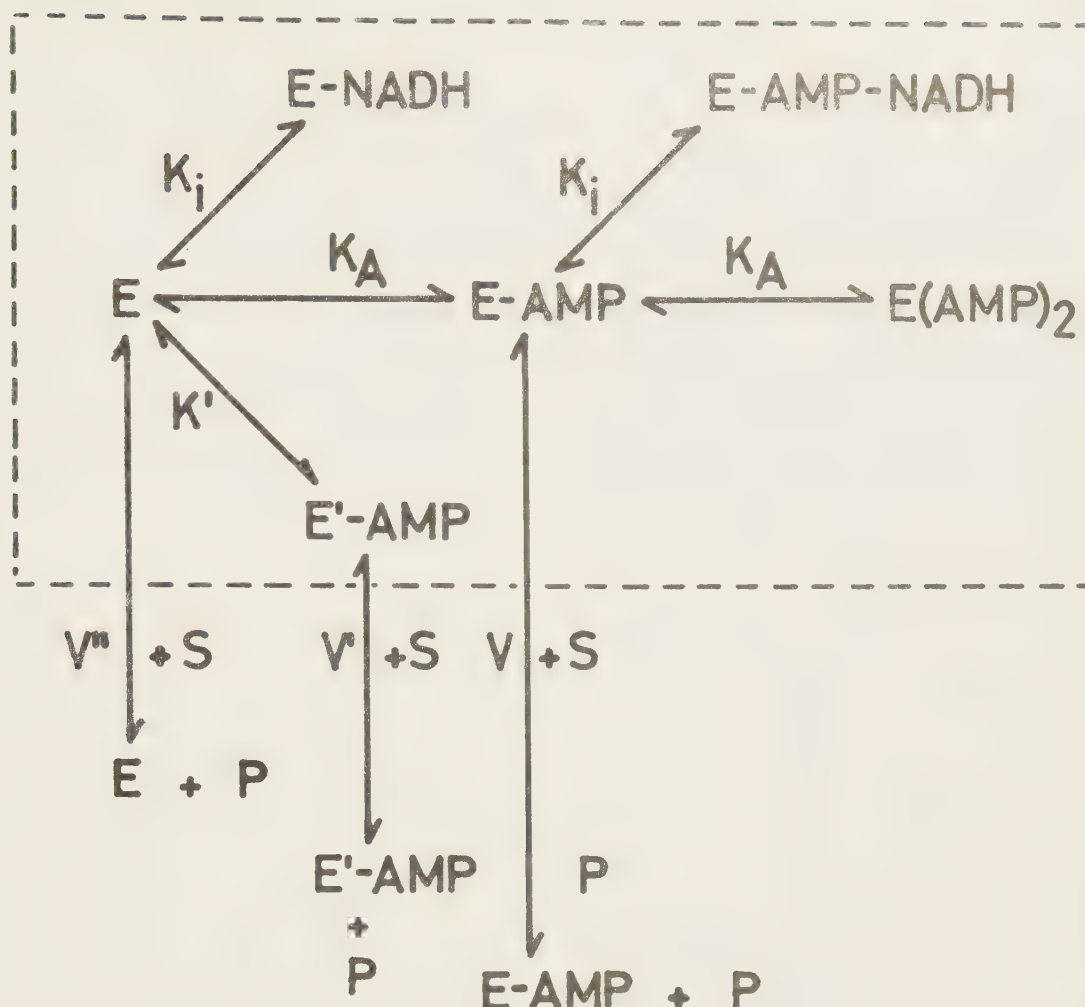
- 1^o) Aux concentrations inférieures à 1 mM en 5'AMP, l'inhibition par NADH est progressivement supprimée et l'activité passe par un optimum entre 1 et 2 mM en AMP.

2°) Au-dessus de 2 mM en AMP apparaît l'interaction sur le site catalytique, provoquant une inhibition.

Pour expliquer ces phénomènes, il est nécessaire de faire état d'un site modulateur commun à NADH et à AMP, site sur lequel NADH induit une inhibition alors que AMP provoque une activation. De plus, AMP peut prendre la place de NADH sur le site catalytique, entraînant une inhibition dès que sa concentration est suffisante pour occuper tous les sites d'une molécule de GDH. Cette interaction est biphasique en raison de l'existence du couplage deux-à-deux des sites catalytiques, couplage mis en évidence au paragraphe III.4.3. 2'-3'AMP ne se fixerait que sur le site modulateur, entraînant vraisemblablement une augmentation de l'affinité pour les substrats d'un facteur 1.5, sans modification de V_{max} . 5'AMP agit sur le site modulateur et peut aussi occuper le site catalytique, conduisant tout d'abord à une activation, puisque, dans le couplage deux-à-deux, le second site occupé augmente la vitesse globale de la réaction. Aux fortes concentrations, il faut tenir compte de la diminution du nombre de sites catalytiques disponibles : ceux-ci étant progressivement occupés par AMP parallèlement à l'augmentation de la concentration du modulateur, il en résulte une inhibition.

Ainsi, le phénomène complet mis en évidence par la figure 30 se traduit par le mécanisme et les caractéristiques suivants :

- suppression de l'inhibition par NADH sur le site modulateur,
- activation parallèle sur le site modulateur,
- activation par effet homotropique sur le site catalytique,
- inhibition progressive par occupation de tous les sites catalytiques.



A ce mécanisme correspond l'expression de la vitesse :

$$v = \frac{S \left\{ \frac{V}{K_A} + \frac{V'}{K'} + V' \right\} \cdot \text{AMP}}{(K_m + S) \left\{ 1 + \frac{\text{NADH}}{K_i} + \frac{\text{AMP}}{K'} + \frac{\text{AMP}}{K_A} + \frac{\text{AMP} \cdot \text{NADH}}{K_A \cdot K_i} + \frac{\text{AMP}^2}{K_A^2} \right\}}$$

III.28)

La réciproque de cette expression en fonction de AMP décrit une courbe voisine de celles de la figure 30.

Dans ce schéma mécanistique n'intervient que le substrat impliqué dans l'activation ou l'inhibition, ici NADH. De plus, il est postulé que tous les équilibres compris dans le rectangle traitillé sont des équilibres rapides par rapport aux réactions catalytiques elles-mêmes.¹³¹

III.4.6. Action de GTP

Bien que l'effet de GTP n'ait pas été étudié ici de manière approfondie, il est toutefois intéressant de signaler que l'inhibition n'est pas aussi importante que dans le cas de l'enzyme du foie (Frieden^{55 56}). A la concentration de 2 μM en GTP, 60 mM en L-Glutamate et pour une concentration en NAD comprise entre 1 et 400 μM , il n'y a pas de différence significative d'activité par rapport au témoin.

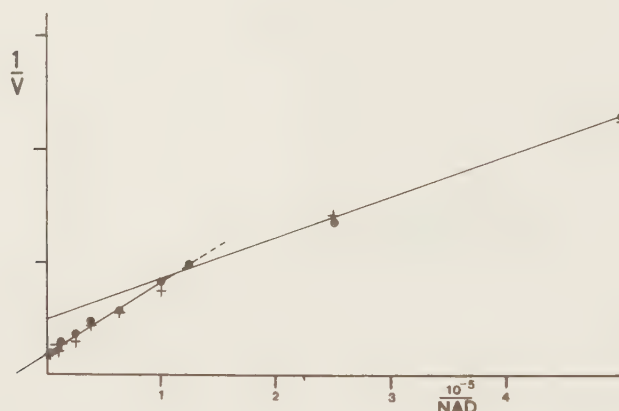


Fig. 31 Action de 2 μM de GTP sur la réaction inverse (- + -). Graphe double réciproque en fonction de la concentration du coenzyme. -●- : témoin.

La figure 31 montre la superposition parfaite du témoin et de l'essai en présence de 2 μM de GTP.

Sur ce point, il y a une différence de comportement de GDH de cerveau et de foie de boeuf, différence de comportement qui ne peut être imputée aux conditions expérimentales.

La seule modification, par rapport au travail de référence⁵⁵, est l'utilisation du tampon Tris-acétate en lieu et place de Tris-HCl.

III.4.7. Effet de la Sérotonine

Cette amine biogène possède une action qui dépend de la concentration en NAD et de l'état conformationnel de l'enzyme, plus exactement l'état d'occupation des sites modulateurs. Dans le domaine d'activation par NAD, aucun effet ne peut être mesuré alors qu'aux faibles concentrations en coenzyme apparaît une faible inhibition (Fig. 32).

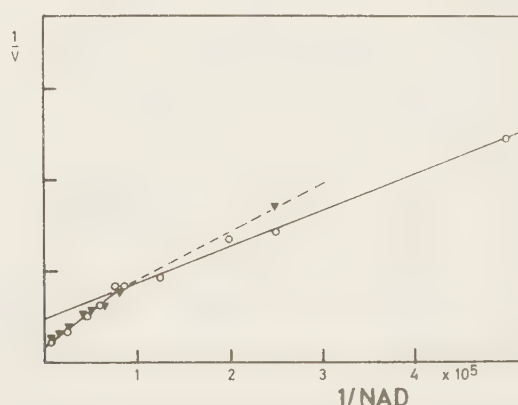


Fig. 32 Action de la sérotonine sur la réaction inverse. Diagramme de Lineweaver-Burk en fonction de la concentration du coenzyme. L'adjonction de 3.14 mM de Sérotonine (-▼-) provoque une légère inhibition aux faibles concentrations du coenzyme alors que l'effet n'est pas perceptible aux concentrations élevées. -O- : témoin.

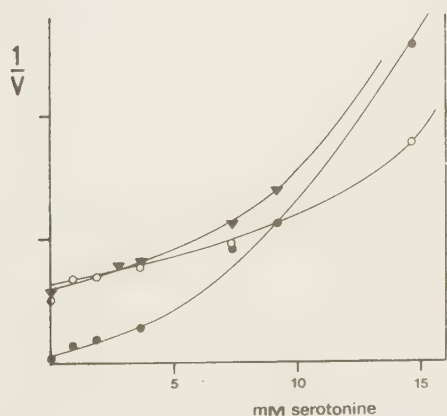


Fig. 33 Action de la sérotonine sur la réaction inverse. Diagramme de Dixon. Dans cette figure les courbes sont représentées suivant deux échelles différentes (ordonnées) : -O- et -▼- : graduation verticale de 0, 50 et 100 ΔA^{-1} .

-●- : graduations verticales de 100, 200 et 300 ΔA^{-1} .

Conditions expérimentales :

-●- : 4 μM NAD, -○- : 40 μM NAD, -▼- : 40 μM NAD + 1 mM

ADP. Pour les trois courbes, la concentration en L-Glu est de 60 mM.

Les courbes d'inhibition (1/v versus Sérotonine) sont d'autant plus abruptes que la concentration en NAD est plus faible (Fig. 33). ADP 1 mM, ajouté dans une des expériences, renforce l'inhibition, bien que n'ayant à lui seul pratiquement aucun effet sur l'enzyme de cerveau à la concentration utilisée.

L'effet d'inhibition par la sérotonine est le même que celui observé par Kaur & Kanungo⁷³ avec l'enzyme du foie. La sérotonine se trouve, selon ces auteurs, associée à l'acétylcholine et la norépinéphrine parmi les amines biogènes inhibitrices. Il est cependant improbable que de telles inhibitions se produisent in vivo car les concentrations utilisées dans ces expériences (plus de 1 mM) dépassent de loin celles que l'on peut s'attendre à rencontrer dans des conditions physiologiques. La concentration in vivo est de l'ordre de la $\mu mole/g$ de tissu⁹⁸. D'autre part, on ne sait rien de la perméabilité de la membrane mitochondriale à l'égard des amines biogènes, et il est possible que GDH ne puisse jamais entrer en contact avec de telles substances.

Appendice

Programme CINSTAT

Ce programme écrit en langage FORTRAN IV version CDC 3800 traite par trois voies successives les données expérimentales de cinétique du steady state :

- A - Lineweaver-Burk
- B - Equation de Michaelis - Menten
- C - Equation de Hill

Les deux premières étapes sont une modification de la méthode de calcul préconisée par Wilkinson ¹³⁹ pour le traitement manuel des données numériques.

A - Lineweaver-Burk

L'équation de Lineweaver-Burk met en relation linéaire l'inverse de la vitesse initiale avec l'inverse de la concentration du substrat :

$$\frac{1}{v_o} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} * \frac{1}{S} \quad 1)$$

Wilkinson montre que la variante de cette expression, s/v_o en fonction de S est caractérisée par une variation du poids statistique relatif beaucoup plus faible dans le domaine des concentrations utilisées.

$$\frac{S}{v_o} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}} * S \quad 2)$$

Les paramètres, ordonnée à l'origine (K_m/V_{max}) et pente ($1/V_{max}$) sont calculés par une méthode de moindres carrés et sont imprimés par le programme, ainsi que les erreurs standard correspondantes. La précision de la régression est donnée par le coefficient de corrélation RXY exprimé en % (d'autant plus proche de 100 que la droite de régression est plus représentative des données expérimentales).

Test de linéarité

Un F-test (s'il y a plusieurs valeurs de y par x) ou un T-test (s'il y a une seule valeur de y par x) permettent d'estimer la validité de l'équation 2) comme représentation des valeurs expérimentales.

Les constantes K_m et V_{max} sont calculées à partir des paramètres de l'équation 2). Elles servent d'estimation provisoire pour la partie B du programme.

B - Equation de Michaelis - Menten

L'équation de Michaelis : $v = \frac{V_{max} * S}{K_m + S}$ est l'équation d'une hyperbole équilatère. Développons cette expression en série de Taylor. Si l'on peut estimer les paramètres avec suffisamment de précision, il est permis de négliger les termes de degré supérieur ¹³⁹.

$$\text{soit } v = f(x, c)$$

Le développement en série donne après simplification selon le texte ci-dessus :

$$f(x, c) = f(x, c_0) + (c - c_0) * f'(x, c_0) \quad \text{où}$$

$$f'(x, c_0) \text{ est la première dérivée de } f(x, c) \text{ par rapport à } c \text{ en } c_0.$$

Si V_0 et K_{m_0} sont les paramètres de Michaelis estimés, alors v est sensiblement égal à :

$$v = \frac{V}{V_0} \left\{ \frac{S * V_0}{S + K_{m_0}} - (K_m - K_{m_0}) \frac{S * V_0}{(S + K_{m_0})^2} \right\} \quad 3)$$

Le traitement de Lineweaver-Burk (partie A) a fourni de très bonnes valeurs des paramètres que nous pouvons utiliser pour la régression telle qu'elle est décrite par l'équation 3).

Le procédé de calcul peut être répété plusieurs fois jusqu'à ce que les coefficients ne soient plus modifiés. En général, trois itérations suffisent. Le programme imprime les valeurs de Vmax et de Km et recalcule l'ordonnée à l'origine et la pente du graphe double réciproque (Lineweaver-Burk) dans la forme la plus couramment utilisée $1/v$ versus $1/s$.

C - Equation de Hill

Il est possible de substituer à la fonction de saturation

$$\frac{\bar{Y}_S}{Y - \bar{Y}_S} \quad \text{l'expression cinétique} \quad \frac{v_O}{V_{\max} - v_O}$$

L'équation de Hill devient :

$$\ln\left(\frac{v_O}{V_{\max} - v_O}\right) = n_H * \ln(S) + \ln(K_{\text{diss}})$$

Dans cette expression linéaire en $\ln(S)$, les coefficients de Hill n_H et $\ln(K_{\text{diss}})$ sont calculés par la même méthode de régression que dans la partie A.

Ci-après, se trouve un protocole du programme CINSTAT écrit en langage FORTRAN IV version CDC 3800, ainsi qu'un exemple d'impression des résultats.

FOR1.3A

05/11/73

```

PROGRAM CINSTAT1
DIMENSION S(25),V(25,5),X(25),Y(25,5),YH(25),KK(25),SS2(25)
DIMENSION YA(25),ZY(25),TTAB(23)
DIMENSION ZEILE(70)
REAL KH,KMM
C      ENTREE DES DONNEES
C      ORDRE DES CARTES DONNEES =          IDENTIFICATION
C                                          NOMBRE DE DONNEES NDATA
C                                          NDATA CARTES DONNEES
C      UNE CARTE CONTENANT LE TEXTE SERIE TERMINEE
C                                          UNE CARTE BLANCHE

      READ 48,TTAB
48      FORMAT(F6.3)
      READ 40,(TTAB(N),N=1,23)
40      FORMAT(10F8.4)
1      READ 36,(ZEILE(N),N=1,70)
36      FORMAT(70A1)
      PRINT 37,(ZEILE(N),N=1,70)
37      FORMAT(1H1,10X,70A1//)
11      READ 12,NDATA
12      FORMAT(I2)
      IF (NDATA) 10,520,10
10      DO 13 N=1,NDATA
      READ 14, S(N),KK(N), (V(N,K),K=1,5)
14      FORMAT(1I0.3,12,8X,5E10.3)
13      CONTINUE
C      CONVERSION DES DONNEES POUR LINEWEAVER-BURK  1/V CONTRE 1/S
      PRINT 202
202      FORMAT(10X,*LINEWEAVER-BURK  DIAGRAMME 1/V CONTRE 1/S*//)
      PRINT 203
203      FORMAT(5X,*KK(N)*,5X,*1/S(N)*,5X,*1/V(N,K)*,/)
      DO 201 N=1,NDATA
      X(N) = 1./S(N)
      KDATA = KK(N)
      DO 200 K=1,KDATA
      Y(N,K) = 1./V(N,K)
200      CONTINUE
      PRINT 204,KK(N),X(N), (Y(N,K),K=1,KDATA)
204      FORMAT(5X,I1,6(5X,E10.3))
201      CONTINUE
C      CONVERSION POUR LINEWEAVER-BURK  S/V CONTRE S
      DO 15 N=1,NDATA
      X(N) = S(N)
      KDATA = KK(N)
      DO 16 K=1,KDATA
      IF (V(N,K)) 17,510,17
17      Y(N,K) = S(N)/V(N,K)
16      CONTINUE
15      CONTINUE
      IHILL = 0
      PRINT18
18      FORMAT(10X,37HLINEWEAVER-BURK  DIAGRAMME S/V SUR S //)
C      MISE A ZERO
598      XKS = 0.
      AK = 0.
      XK2 = 0.

```

FOR1.3A

05/11/73

```

X2 = 0.
YXMS = 0.
Y2 = 0.
SY = 0.
XYS = 0.
SDM = 0.
XKMS = 0.
SSWIN = 0.
SST = 0.
XKMS = 0.
SSM = 0.
FREG = 0.
C REGRESSION LINEAIRE
C CALCUL DES EXPRESSIONS
DO 21 N=1,NDATA
AK = AK + KK(N)
X2 = X2 + (X(N)*X(N))
XK2 = XK2 + (KK(N)*(X(N)**2))
XKS = XKS + (KK(N)*X(N))
YS = 0.
KDATA = KK(N)
DO 22 K=1,KDATA
Y2 = Y2 + (Y(N,K)**2)
YS = YS + Y(N,K)
XYS = YYS + (X(N)*Y(N,K))
22 CONTINUE
SY =SY + YS
YM(N) = YS/KK(N)
21 CONTINUE
ADATA = NDATA
XM = XKS/AK
YMM = SY/AK
DO 23 N=1,NDATA
KDATA = KK(N)
DO 24 K=1,KDATA
SDM = SDM + KK(N)*((YM(N)-YMM)**2)
XMYS = XMYS + ((X(N)-XM)*(Y(N,K)-YMM))
SSWIN = SSWIN + ((Y(N,K)-YM(N))**2)
SST = SST + ((Y(N,K)-YMM)**2)
24 CONTINUE
XKMS = XKMS + (KK(N)*((X(N)-XM)**2))
YXMS = YXMS + YYS*(YM(N) - YMM)
23 CONTINUE
AMSR = XMYS*XMYS/XKMS
SSR = Y2 -((SY**2)/AK)
C CALCUL DES PARAMETRES
SXX = XK2 - (XKS**2)/AK
SXY = YYS - (XKS*SY/AK)
SLOPE = SXY/SXX
AM = YMM - (SLOPE*XM)
PRINT 25,AM,SLOPE
25 FORMAT(20X,4HY = ,E10.3,3H + ,E10.3,5H * X /)
C TESTS STATISTIQUES
L = NDATA - 2
LL = AK - ADATA
SREG = SXY*SXY/SXX

```

FOR1.3A

05/11/73

```

S2 = (SST - SREG)/(AK - 2.)
DO 39 N = 1, NDATA
VYX = S2*((1./AK) + ((X(N) - XM)*(X(N) - XM)/SXX))
EY(N) = TTAB(L) * SQRT(VYX)
39 CONTINUE
C CALCUL DES ERREUR STANDARD SUR SLOPE ET AM
VSLOP = S2/XKMS
IF(VSLOP.LE.0) GOTO212
SESLO = SQRT(VSLOP)
VAM = (XK2/(AK*XKMS))*S2
IF(VAM.LE.0) GOTO212
SEAM = SQRT(VAM)
IF(AK.EQ.ADATA)26,27
26 FREG = SREG/S2
IF(FREG.LE.0) GOTO 212
FREG = SQRT(FREG)
GOTO 30
27 DO 28 N=1,NDATA
SSH = SSM + KK(N) * ((YM(N) - YMM - (SLOPE * (X(N) - XM)))**2)
28 CONTINUE
AL = LL/L
FREG = AL * SSM / SSWIN
C CALCUL DU COEFFICIENT DE CORRELATION
30 RXY = XMY/SQRT(XKMS*SST)
RXY = RXY*RXY*100.
IF(AK.EQ.ADATA)45,46
45 PRINT 47,FREG,L,TAB,SESLO,SEAM
47 FORMAT(10X,20HTEST DE LINEARITE = ,E10.3,5X,1H(,I2,1H,,F6.3,1H)//
120X,28HERREUR STANDARD SUR PENTE = ,E10.3/20X,28HERREUR STANDARD S
2UR ORDOR = ,E10.3//)
GOTO 43
46 PRINT 35, FREG, L,LL,SESLO,SEAM
35 FORMAT(10X,20HTEST DE LINEARITE = ,E10.3,5X,1H(,I2,1H,,I2,1H)//
120X,28HERREUR STANDARD SUR PENTE = ,E10.3/20X,28HERREUR STANDARD S
2UR ORDOR = ,E10.3//)
49 PRINT 34,RXY
34 FORMAT(10X,6HRXY = ,F10.3,* 0/0*)
IF(IHILL.EQ.1) GOTO 601
C IMPRESSION DES DONNEES
PRINT 38
38 FORMAT(//5X,5HKK(N),5X,4HS(N),5X,6HV(N,K),5X,11HS(N)/V(N,K)/)
DO 31 N=1,NDATA
KDATA = KK(N)
PRINT 32 ,KK(N),S(N),(V(N,K),K=1,KDATA),(Y(N,K),K=1,KDATA)
32 FORMAT (5X,I1,11(5X,E10.3))
31 CONTINUE
KM = A1/SLOPE
VM = 1./SLOPE
IF(KM.LT.0) GOTO 210
IF(VM.LT.0) GOTO 210
PRINT 33,KM,VM
33 FORMAT(1H0,10X,5HKM = ,E12.4,5X,6HVMAX = ,E12.4//)
PRINT 44,TAB
44 FORMAT(35X,1HY,18X,2HY-,18X,2HY+,18X,*LIMITE DE CONFIANCE A *,F6.3
1,* 0/0*)
DO 42 N =1,NDATA

```

FOR1.3A

05/11/73

```

      YYY = AM + SLOPE * X(N)
      YMOINS = YYY - EY(N)
      YPLUS = YYY + EY(N)
      PRINT 43,YYY,YMOINS,YPLUS,EY(N)
43    FORMAT(20X,4(10X,E10.3))
42    CONTINUE
C      MICHAELIS MENTEN
C      TRANSFORMATION DES DONNEES
500  DO 501 N=1,NDATA
      X(N) = S(N)
      YA(N) = 0.
      KDATA = KK(N)
      DO 502 K =1,KDATA
      YA(N) = YA(N) + V(N,K)
502  CONTINUE
      YA(N) = YA(N)/KK(N)
501  CONTINUE
      PRINT 511
511  FORMAT(1H0,10X,41H EQUATION DE MICHAELIS-PENTEN = HYPERBOLE//)
C      MISE A ZERO
      J = 0
509  ETHA = 0.
      ALPHA = 0.
      BETA = 0.
      GAMA = 0.
      DELTA = 0.
      EPSI = 0.
      B1 = 0.
      B2 = 0.
      DO 503 N=1,NDATA
      A = X(N)*VM
      B = X(N) + KM
      ETHA = ETHA + (YA(N)**2)
      ALPHA = ALPHA + ((A/B)**2)
      BETA = BETA + ((-A/(B**2))**2)
      GAMA = GAMA - ((A**2)/(B**3))
      DELTA = DELTA + YA(N)*(A/B)
      EPSI = EPSI - YA(N)*(A/(B**2))
503  CONTINUE
      DDELT = ALPHA * BETA - (GAMA**2)
      B1 = ((BETA*DELTA) - (GAMA*EPSI))/DDELT
      B2 = ((ALPHA*EPSI) - (GAMA*DELTA))/DDELT
      VM1 = B1*VM
      KMM = B2 / B1 + KM
      J = J + 1
      PRINT 507,J,VM1,KMM
507  FORMAT(10X,I1,5X,5HVM = ,E10.3,5X,5HKM = ,E10.3)
      IF (J-5) 505,504,505
505  KM = KMM
      VM = VMM
      GOTO 509
504  S2 = (ETHA - (B1*DELTA) - (B2*EPSI))/(NDATA-2)
      SEKM = (SQRT(S2)/B1)* SQRT(ALPHA/DDELT)
      SEVM = (VM * SQRT(S2)) * SQRT(BETA/DDELT)
      PRINT 506,KMM,SEKM,VMM,SEVM
506  FORMAT(//10X,5HKM = ,E10.3,10X,18HERREUR STANDARD = ,E10.3,/10X,

```

FOR1.3A

05/11/73

```

15HV,1 = ,E10.3,10X,13HERREUR STANDARD = ,E10.3/)
DO 512 N=1,NDATA
  VT = X(N)*VMM/(KMM + X(N))
  PRINT 513,VT
513   FORMAT(10X,6HV T = ,E10.3)
512   CONTINUE
      KM = KMM/VMM
      VM = 1./VMM
      PRINT 514,KM,VM
514   FORMAT(1H0,20X,8HSLOPE = ,E10.3,10X,12HINTERCEPT = ,E10.3//)
      DO 600 N=1,NDATA
        KK(N) = 1
        YM(N) = X(N) /YM(N)
        X(N) = LOGF(X(N))
        A = YM(N) / (VMM- YM(N))
        Y(N,1) = LOGF(A)
600   CONTINUE
      IHILL = 1
      PRINT 515
515   FORMAT(10X,*DIAGRAMME DE HILL   LN(V/ VM-V)   SUR   LN(S)*//)
      GOTO 598
601   PRINT 605
605   FORMAT(27X,*LN(S)*,11X,*LN(V/VM-V)*//)
      PRINT 602,(X(N),YM(N),N=1,NDATA)
602   FORMAT(10X,2(10X,F10.5))
      AM = EXPF(-AM)
      PRINT 604,AM,SLOPE
604   FORMAT(/ 20X,*KDISS = *,E10.3,10X,*NH = *,F6.3//)
510   GOTO 1
210   PRINT 211
211   FORMAT(10X,*MODELE LINEAIRE NON SATISFAISANT*)
      GOTO 1
212   PRINT 213
213   FORMAT(10X,*DONNEES INSUFFISANTES*)
      GOTO 1
520   CALL EXIT
      END

```

LOAD
 RUN,2,2000

1/6/72 LGLUNA SUBSTR. FIXE VARIABLE 10MM NAD VARIABLE G0H=.020MG/MLA

LINEWEAVER-BURK DIAGRAMME 1/V CONTRE 1/S

DIAGRAMME DE HILL LN(V/ VM-V) SUR LN(S)

KK(N) 1/S(N) 1/V(N,K)

1 5.000+005 1.190+003
1 3.333+005 8.475+002
1 2.500+005 6.329+002
1 2.000+005 4.975+002
1 1.250+005 3.401+002

LINEWEAVER-BURK DIAGRAMME S/V SUR S

Y = 2.325-003 + 4.727+001 * X

TEST DE LINEARITE = 3.272+000 (3, 0.010)

ERREUR STANDARD SUR PENTE = 1.445+001
ERREUR STANDARD SUR ORDOR = 7.010-005

RXY = 78.115 0/0

KK(N) S(N) VN(K) S(N)/V(N,K)

1 2.000-006 8.400-004 2.381-003
1 3.000-006 1.180-003 2.542-003
1 4.000-006 1.580-003 2.532-003
1 5.000-006 2.010-003 2.488-003
1 8.000-006 2.940-003 2.721-003

KM = 4.9176-005 VMAX = 2.1154-002

Y Y-
2.419-003 2.212-003
2.467-003 2.303-003
2.514-003 2.376-003
2.561-003 2.420-003
2.703-003 2.431-003

EQUATION DE MICHAELIS-MENTEN = HYPERBOLE

1 VM = 1.963-002 KM = 4.489-005
2 VM = 1.975-002 KM = 4.551-005
3 VM = 1.975-002 KM = 4.552-005
4 VM = 1.975-002 KM = 4.552-005
5 VM = 1.975-002 KM = 4.552-005

KM = 4.552-005 ERREUR STANDARD = 1.273-005
VM = 1.975-002 ERREUR STANDARD = 4.888-003

V T = 8.3115-004
V T = 1.221-003
V T = 1.596-003
V T = 1.955-003
V T = 2.953-003

SLOPE = 2.304-003

INTERCEPT = 5.062+001

Y = 1.007+001 + 1.006+000 * X

TEST DE LINEARITE = 3.648+001 (3, 0.010)

ERREUR STANDARD SUR PENTE = 2.757-002
ERREUR STANDARD SUR ORDOR = 3.433-001

RXY = 99.775 0/0

LN(S) LN(V/VM-V)
-13.12236 -3.11425
-12.71690 -2.75624
-12.42922 -2.44256
-12.20607 -2.17791
-11.73607 -1.74379

KDISS = 4.246-005

NH = 1.006

LIMITE DE CONFIANCE A 0.010 0/0

Y+
2.627-003 2.074-004
2.630-003 1.633-004
2.651-003 1.376-004
2.702-003 1.407-004
2.975-003 2.721-004

IV. CONCLUSIONS

Le travail ci-dessus, s'il ne répond pas complètement aux questions posées dans le préambule, a permis toutefois de caractériser GDH du système nerveux par rapport aux autres enzymes du même groupe.

La GDH joue un rôle important d'incorporation de l'azote dans les chaînes carbonées, dans l'ensemble des organismes vivants. Dans certaines conditions physiologiques, ce phénomène s'inverserait pour fournir le cycle Tricarboxylique en 2-oxo-glutarate. Cette fonction particulièrement importante pour le système nerveux soulève deux problèmes majeurs :

- 1^o dans le sens inverse, la réaction catalysée par GDH doit franchir une barrière énergétique importante, puisque l'énergie libre de la réaction est de + 18.28 Kcal/mole;
- 2^o la déamination de L-glutamate conduit à une libération d'ammoniaque qui doit être métabolisée d'une manière ou d'une autre pour éviter son effet toxique.

D'un point de vue purement spéculatif, il a été montré dans le préambule que le couplage de la réaction de déamination avec l'amidation d'une seconde molécule de L-Glu (catalysée par la Glutamine synthétase) peut surmonter et l'un et l'autre des problèmes soulevés ici.

GDH de cerveau, pas plus que l'enzyme du foie, n'a de propriétés catalytiques propres à favoriser la réaction inverse. Par contre, de nombreux systèmes régulateurs sont à disposition pour le maintien d'un équilibre physiologique du taux d'acide glutamique. C'est par exemple le site modulateur capable de fixer L-Glu ou D-Glu (que nous appellerons M^S), le site activateur spécifique pour AMP (M^N), le site activateur à NAD ou inhibiteur à NADH. Par l'aspect non standard

de plusieurs graphes cinétiques, il apparaît clairement que GDH est un enzyme à sites multiples, vraisemblablement au nombre de six par unité active (Egan & Dalziel³⁵, Cross²⁶). Huang & Frieden⁷⁰ ne trouvent pas d'évidence d'une interaction coopérative entre les sites de l'hexamère ou unité active.

Pourtant, une explication plausible de l'activation par NAD présentée ci-dessus fait état d'un couplage deux-à-deux des sous-unités, avec un effet homotropique coopératif négatif, dont l'expression algébrique a exactement la même forme que l'équation proposée par Frieden⁵¹. Un tel modèle suppose que les trois paires formant l'unité active travaillent indépendamment les unes des autres, mais cela n'est qu'une approximation imposée par le manque d'information, inhérent à la méthode du steady state, qui ne permet pas de déterminer les constantes de dissociation pour chacun des six sites. Du seul point de vue des résultats présentés ici, il n'est pas possible de choisir entre le modèle faisant appel à un site modulateur à NAD (activateur de type M^N) et le modèle tenant compte d'une interaction entre les sites de deux protomères voisins (cf. III.4.3). La différence observée entre les paramètres déterminés à partir de ces deux modèles et à partir des diagrammes de Hill n'est pas significative.

GDH de cerveau comme GDH de foie est un système complexe qui comporte dans une unité active les sites suivants :

$$\left. \begin{array}{ll} \text{Substrat} & : A_i^S \\ \text{Coenzyme} & : A_i^N \\ \text{Modulateur} & : M_i^N \end{array} \right\} \quad \text{où } i > 2$$

L'indice S signifie : substrat ou pseudo-substrat

L'indice N signifie : coenzyme ou nucléotide

Etant donné la ressemblance avec l'enzyme du foie, il est permis d'admettre qu'il existe un site de chaque espèce par protomère (Apella & Tomkins³ montrent que GDH de foie est constituée de six chaînes peptidiques identiques).

Ces résultats sont en parfait accord avec le schéma proposé par Frieden à la suite d'une série d'articles publiés entre 1959 et 1972⁵¹⁻⁵⁷, 22-24, 26.

Frieden reconnaît un site modulateur spécifique à NADH (inhibiteur) et un autre pour les autres purines, deux sites qui correspondent au site M^N . La compétition de AMP (activateur) avec NADH (inhibiteur à forte concentration) (cf. III.4.5) ne permet pas, pour lors, de distinguer, pour les deux modulateurs, deux sites atagonistes, dont l'un serait spécifique à NADH et l'autre à AMP. Provisoirement du moins, la thèse d'un seul site pour les deux modulateurs est retenue. Sanner¹¹⁴ dans un travail sur GDH de *Blastocladiella*, montre l'indépendance des sites à AMP et à NAD, même dans des conditions favorables à l'activation par excès de NAD.

Frieden⁵¹ explique l'activation due à NAD par l'intermédiaire d'un site activateur à purines (M^N), cependant qu'Engel & Ferdinand⁴² invoquent un mécanisme multisites avec interactions. Ces dernier auteurs font reposer leur raisonnement sur des considérations algébriques, ce qui permet difficilement de reconstruire un mécanisme enzymatique proprement dit. Mais les indications que l'on peut tirer de leur étude, sont les caractéristiques d'un mécanisme enzymatique de type induced fit⁷⁷ dans lequel s'établit une hiérarchie du point de vue de l'affinité des sites demeurés libres pour les ligands, à mesure de l'occupation de ces sites. Dalziel & Engel²⁷ font une proposition similaire, qui correspond exactement à la proposition faite dans ce travail.

Des travaux portant sur l'enzyme du foie ont montré que la fixation de NADH sur GDH conduit en effet à un "red shift" (complexe E-NADH et E-NADH-L-Glu) ou un "blue shift" (complexe ternaire E-NADH-2-oxoglutarate) (Iwatsubo et al.²⁹, Cross²⁶). Le fait que la présence du céto acide à la place de L-Glu produit un shift en sens inverse est sans doute l'indication d'une grande proximité des sites à coenzyme et à substrat, un transfert de charge n'étant possible qu'à faible distance.

Engel & Dalziel^{40 41} d'une part, et Frieden⁵⁶ d'autre part, ont tenté de montrer la nature aléatoire respectivement séquentielle de la réaction catalysée par GDH de foie, sans pouvoir apporter de conclusion définitive. Les études récentes de cinétique rapide ont mis en évidence un certain nombre de complexes enzyme - ligand comprenant au moins un nucléotide. Les complexes binaires GDH-L-Glu et GDH-2-oxoglutarate n'ont pu être mis en évidence par une méthode spectroscopique directe.

Les complexes binaires suivants peuvent être décelés par des méthodes spectroscopiques directes :

GDH - NADH
GDH - NADPH (di Franco & Iwatsubo²⁵)

Les complexes ternaires observés par la même méthode sont les suivants :

GDH - NADH - 2-oxoglutarate (Cross²⁶)
" - NADPH - 2-oxoglutarate (di Franco & Iwatsubo²⁹)
" - NADH - L-Glu (Cross²⁶) (Shafer & al.¹²⁰)
" - NADPH - L-Glu (di Franco & Iwatsubo²⁹)
" - NADPH - D-Glu (ibidem²⁹)
" - NADPH - NH_4^+ (ibidem²⁹)

Les considérations cinétiques présentées ici peuvent parfaitement s'expliquer par la structure quaternaire de GDH, point sur lequel les deux enzymes, du foie et du cerveau, ne présentent pas de différences fondamentales.

De nombreux travaux ont paru sur la structure quaternaire et le poids moléculaire de GDH de foie de boeuf et d'autres vertébrés, Olson & Anfinsen¹⁰⁴, Rogers et al.¹¹³, Marler & Tanford⁹⁷, Sund & Burchard¹²⁹, Krause et al.⁷⁸, Sund et al.¹³⁰, Piltz & Sund¹⁰⁶, Markau et al.⁹⁶, Cassman & Schachman¹⁵. Il est intéressant de souligner la similitude de structure et de poids moléculaire des deux isoenzymes du foie et du cerveau. Les principales caractéristiques de ce dernier enzyme sont rappelées ci-dessous, et correspondent exactement à celles de GDH de foie.

L'unité active comporte six chaînes de 57 000 daltons chacune, soit un total de 340 000, les six chaînes sont disposées par trois dans deux plans superposés. La symétrie de l'édifice moléculaire est réduite par un décalage d'un angle $\Phi < 45^\circ$ entre ces deux triangles définis dans les deux plans³⁶. Ainsi, du point de vue géométrique, sont à distinguer deux types de liaisons :

- a) Liaisons reliant les deux protomères situés dans un même plan (liaison horizontale).
- b) Liaisons joignant deux protomères situés dans deux plans distincts (liaison verticale).

Il semble que ce dernier type de liaison soit assez stable pour que des di-protomères se forment en solution diluée, ce qui est effectivement observé dans les images de microscopie électronique (Fig. 11 et 12). D'autre part, l'amine quaternaire chlorure de Zephiran, dissocie les unités actives

en di-protomères de 115 000 daltons (l'effet du chlorure de Zephiran reste à étudier de manière plus approfondie, cf. paragraphe II). C'est à l'intérieur de ces dimères que prennent place les interactions entre sites catalytiques, par des mécanismes de type transfert de charge, probablement.

L'existence d'un complexe binaire E-coenzyme n'est pas une preuve d'un système séquentiel, c'est un ensemble d'observations qui ont conduit les uns à considérer la réaction comme séquentielle, et les autres, comme aléatoire.

Ainsi, la courbure des graphes de second ordre (cf. III.2) restée partiellement inexpliquée, traduit vraisemblablement l'interaction des sites A^S et A^N . L'interaction ayant lieu aussi bien dans le sens coenzyme-substrat que substrat-coenzyme, il faut penser comme Colen & Fisher²², à un équilibre aléatoire rapide de la formation du complexe ternaire, rejoignant en cela la conception d'Engel & Dalziel⁴¹.

Deux évidence permettent d'affirmer que GDH de foie et GDH de cerveau sont deux isoenzymes et non une seule et même protéine :

- la mobilité électrophorétique de l'enzyme du cerveau est plus élevée que celle de l'enzyme du foie (à pH 8.6);
- les points isoélectriques sont différents : 4.89 pour GDH de cerveau et 5.38 pour l'enzyme du foie (Boehringer).

Ces deux caractéristiques traduisent des différences dans la composition en acides aminés confirmés par les analyses préalables réalisées dans notre laboratoire par F. Erard.

La spécificité à l'égard du substrat est très semblable pour les deux isoenzymes. Mis à part L-Glu, qui est le substrat naturel, L-Norvaline donne une activité de 20%, alors que les autres acides aminés donnent une activité inférieure à 5% (autres GDH : Baratt & Strickland⁵, Struck & Sizer¹²⁸, Blässler und Hammar⁷). Cette spécificité découle de la nature du centre actif qui comporte vraisemblablement deux groupes cationiques espacés d'environ 5 à 10 Å, fixant les carboxyles du substrat par des liaisons ioniques, et un subsite dédoublé, dont une moitié est anionique et correspond à l'amine α, l'autre, qui sert au maintien du groupe céto de 2-oxo-glutarate sur l'enzyme, est électrophile. La transition de sp³ (dans l'acide-amino) en sp² (dans le céto-acide) implique un mouvement de bascule de la chaîne latérale du substrat. Ceci n'est possible que si la molécule, lorsqu'elle est maintenue entre les deux points de fixation cationiques, n'est pas soumise à une trop forte tension interne. Pour cela, il faut au substrat une chaîne de 5 carbones pour obtenir une activité optimale. L'acide aspartique qui n'en possède que 4, donne une activité inférieure à 1%.

Les constantes de Michaelis sont comparées avec les valeurs parues dans la littérature dans le tableau IV.1

TABLEAU IV.1

K_M^{L-Glu}	Source de l'enzyme	références
1.1 * 10 ⁻³	foie de boeuf	104, 105
1.8 * 10 ⁻³	foie de boeuf	51
84.0 * 10 ⁻³	foie de roussette	25
1.43 * 10 ⁻³	Blastocladiella	89
2.5 * 10 ⁻³	Thiobacillus novellus	88
1.3 * 10 ⁻²	cerveau de boeuf	

Le turnover number de GDH de cerveau est de 158 min^{-1} pour une concentration en enzyme de $20 \text{ } \mu\text{g/ml}$ rapportée à un poids moléculaire de 340 000. Cette valeur est inférieure à celle obtenue par Kempfle et al.⁷⁴ avec GDH de foie. Selon ces auteurs, le T.N. passe de 135 à 300 min^{-1} (poids moléculaire utilisé pour les calculs : 310 000) suivant l'état d'aggrégation des molécules. La différence observée peut donc s'expliquer simplement par l'état d'aggrégation de l'enzyme.

Dans le cortex cérébral, GDH se localise principalement à l'intérieur des mitochondries (Matrix). Il n'a pas été tenu compte de la répartition de l'enzyme dans les grandes et les petites mitochondries dont l'existence a été mise en évidence par Neidle et al.¹⁰².

Certaines cellules du foie contiennent en plus de l'enzyme mitochondrial, une forme nucléaire³⁰, qui n'a pas été mise en évidence pour le moment dans le cerveau. C'est par conséquent certainement l'enzyme mitochondrial qui joue le rôle prépondérant dans le système nerveux.

BIBLIOGRAPHIE *)

1. Adair, G. S. Proc. Roy. Soc. Ser. A. 109, 292 (1925)
2. Adair, G. S. JBC. 63, 529 (1925)
3. Appella, E., and Tomkins, G. M. JMB. 18, 77 (1966)
4. Arnold, H., and Maier, K. P. BBA. 251, 133 (1971)
5. Barrat, R. W., and Strickland, W. N. Arch. Biochem. Biophys. 102, 66 (1963)
6. Barton, J. S., and Fisher, J. R. Biochem. 10, 577 (1971)
7. Bässler, K. H., und Hammar, C. H. Biochem. Zeitschr. 330, 446 (1958)
8. Beloff, et al. Proc. Roy. Soc. Ser. B. 144, 22 (1955)
9. Bhagavan, H. N., Coursin, D. B., and Stewart, C. N. Nature. 232, 275 (1971)
10. Bitensky, M. W., Yielding, L., and Tomkins, G. M. JBC. 240, 663 (1965)
11. Brattin, W. J. Jr., and Smith, E. L. JBC. 246, 2400 (1971)
12. Burde, R. M., Schainker, B., and Kayes, J. Nature. 233, 58 (1971)
13. Burton, K., and Krebs, H. A. Biochem. J. 54, 94 (1953)
14. Buttler, P. J. G., Harris, J. T., Hartley, S. S., and Leberman, R. Biochem. J. 112, 679 (1969)
15. Cassman, M., and Schachman, H. K. Biochem. 10, 1015 (1971)
16. Chun, P. W., Kim, S. J., Stanley, C. A., and Ackers, G. K. Biochem. 8, 1625 (1969)
17. Chun, P. W., and Kim, S. J. Biochem, 8, 1633 (1969)
18. Cleland, W. W. BBA. 67, 104 (1963)
19. Cleland, W. W. BBA. 67, 107 (1963)
20. Cleland, W. W. BBA. 67, 173 (1963)
21. Colen, A. H., Prough, A., and Fisher, H. F. JBC. 247, 7905 (1972)
22. Colman, R., and Frieden, C. JBC. 241, 3652 (1966)
23. Colman, R., and Frieden, C. JBC. 241, 3661 (1966)
24. Colman, R., and Frieden, C. BBRC. 22, 100 (1966)

*) Pyridine Nucleotide Dependant Dehydrogenases. H. Sund editor. Springer Verlag. 1970., est abrégé ici par PNDD et se réfère aux articles publiés sous forme de "preprints" en septembre 1969.

25. Corman, L., Prescott, L.M., and Kaplan, N.O. JBC. 242, 1383 (1967)
26. Cross, D.G., and Fisher, H.F. JBC. 245, 2612 (1970)
27. Dalziel, K., and Engel, P.C. FEBS Letters. 1, 349 (1968)
28. Di Franco, A., and Iwatsubo, M. Biochimie. 53, 153 (1971)
29. Di Franco, A., and Iwatsubo, M. Eur. J. Biochem. 30, 517 (1972)
30. Di Prisco, G., Banay-Schwartz, M., and Strecker, H.J.
PNDD, 305 (1969)
31. Di Prisco, G., and Strecker, H.J. Eur. J. Biochem. 9, 507 (1969)
32. Di Prisco, G., and Strecker, H.J. Eur. J. Biochem. 12, 483 (1970)
33. Dixon, M. Biochem. J. 54, 457 (1953)
34. Dregger, E.E., Keim, G.I., Miles, G.D., Shedlovski, and Ross, J.
Ind. Chem. July, 610 (1944)
35. Egan, R.R., and Dalziel, K. BBA. 250, 47 (1971)
36. Eisenberg, H. PNDD, 293 (1969)
37. Eisenberg, H. Account. Chem. Research. November, 379 (1971)
38. Eisenberg, H., and Tomkins, G.M. JMB. 31, 37 (1968)
39. Engel, P.C., and Dalziel, K. Biochem. J. 105, 691 (1967)
40. Engel, P.C., and Dalziel, K. PNDD, 245 (1969)
41. Engel, P.C., and Dalziel, K. Biochem. J. 118, 409 (1970)
42. Engel, P.C., and Ferdinand, W. Biochem. J. 131, 97 (1973)
43. Erwin, V.G. Mol. Pharmacol. 5, 615 (1969)
44. Fisher, H.H., McGregor, L.L., Bard, J.R., and Cross, D.G. Fed. Proc.
28, 602 (1969)
45. Fisher, H.F., and Bard, J.R. BBRC. 37, 581 (1969)
46. Fisher, H.F., and McGregor, L.L. JBC. 236, 791 (1961)
47. Fisher, H.F., McGregor, L.L., and Cross, D.G. BBA. 65, 175 (1962)
48. Fisher, H.F. et al. JBC. 247, 7905 (1972)
49. Fourcade, A. Bull. Soc. Chim. Biol. 50, 1671 (1968)
50. Freedmann, R.B., and Radda, G.K. Biochem. J. 10, 5 (1968)
51. Frieden, C. JBC. 234, 809 (1959)
52. Frieden, C. JBC. 234, 815 (1959)
53. Frieden, C. JBC. 234, 2891 (1959)

54. Frieden, C. JBC. 237, 2396 (1962)
55. Frieden, C. BBA. 59, 484 (1962)
56. Frieden, C. JBC. 238, 3286 (1963)
57. Frieden, C. BBRC. 10, 410 (1963)
58. Frieden, C. JBC. 245, 5788 (1970)
59. Frieden, C., and Colman, R. JBC. 242, 1705 (1967)
60. Frieden, C., and Velick, S. F. BBA. 23, 439 (1957)

61. Gray, E. G., and Whittaker, V. P. J. Anat. 96, 79 (1962)
62. Grisolia, S., Quijada, C. L., and Fernandez, M. BBA. 81, 61 (1964)

63. Haglund, H. Science Tools LKB. 14, 17 (1967)
64. Hedrick, J. L., and Smith, A. J. Arch. Biochem. Biophys. 126, 155 (1968)
65. Henderson, R. F., and Henderson, T. R. Arch. Biochem. Biophys.
129, 86 (1969)
66. Hill, A. V. Physiol. J. (London) 40, IV (1910)
67. Hochreiter, M. C., and Schellenberg, K. A. JACS. 91, 6530 (1969)
68. Hochreiter, M. C., Patek, D. R., and Schellenberg, K. A. JBC.
247, 6271 (1972)
69. Horne, R. W., and Greville, G. D. JMB. 6, 506 (1963)
70. Huang, C. Y., and Frieden, C. JBC. 247, 3638 (1972)

71. Jallon, J. M., di Franco, A., and Iwatsubo, M. Eur. J. Biochem. 13,
428 (1970)
72. Josephs, R., and Borisky, G. JMB. 65, 127 (1972)

73. Kaur, G., and Kanungo, M. S. Indian. J. Biochem. 7, 170 (1971)
74. Kempfle, M., Mösebach, K. O., and Winkler, H. FEBS Letters.
19, 301 (1972)
75. King, E. L., and Altman, C. J. Phys. Chem. 60, 1375 (1956)
76. Klotz, I., Langerman, N. R., and Darnall, D. W. Annual Review
of Biochem. 39, 25 (1970)

77. Koshland, D. E. Jr., Némethy, G., and Filmer, D. *Biochem.* 5, 365 (1966)
78. Krause, J., Markau, K., Minsén, M., and Sund, H. *PNDD*, 279 (1969)
79. Kubo, H., Yamano, T., Iwatsubo, M., Watari, H., Soyama, T., Shiraishi, J.,
Sawada, S., Kawashima, N., Mitani, S., and Ito, K.
Bull. Soc. Chim. Biol. 40, 431 (1958)
80. Landon, M., and Smith, E. L. *JBC.* 246, 3789 (1971)
81. Landon, M., Langley, T. J., and Smith, E. L. *JBC.* 246, 3802 (1971)
82. Landon, M., Langley, T. J., and Smith, E. L. *JBC.* 246, 3807 (1971)
83. Landon, M., Melamed, M. D., and Smith, E. L. *JBC.* 246, 2360 (1971)
84. Landon, M., Piszkievicz, D., and Smith, E. L. *JBC.* 246, 2374 (1971)
85. Laurent, T. C., and Killander, J. J. *Chrom.* 14, 317 (1964)
86. Lehman, F. G. *BBA.* 235, 259 (1971)
87. Leighton, F., Poole, B., Beaufray, H., Bandhuin, P., Coffey, J. W.,
Fowler, S., and de Duve, C. J. *Cell. Biol.* 37, 483 (1968)
88. Lejohn, H. B. *BBRC.* 28, 96 (1967)
89. Lejohn, H. B., and Jackson, S. *JBC.* 243, 3447 (1968)
90. Lejohn, H. B., and McCrea, B. E. J. *Bact.* 95, 87 (1968)
91. Levy, H. R., and Vennesland, B. *JACS.* 228, 85 (1957)
92. Lineweaver, H., and Burk, D. *JACS.* 56, 658 (1934)
93. Loenig, E. U. *Biochem. J.* 102, 251 (1967)
94. Maizel, J. V. *Science.* 151, 988 (1966)
95. Malcolm, A. D. B. *Eur. J. Biochem.* 27, 453 (1972)
96. Markau, K., Schneider, J., and Sund, H. *Eur. J. Biochem.* 24, 393 (1971)
97. Marler, E., and Tanford, C. *JBC.* 239, 4217 (1964)
98. McIlwain, H. *Biochemistry and the central nervous system.*
Churchill. Third edition. (1966)
99. Millonig, G. J. *Appl. Phys.* 32, 1637 (1966)
100. Monod, J., Wyman, J., and Changeux, J. P. *JMB.* 12, 88 (1965)

101. Nakamoto, T., and Vennesland, B. JBC. 235, 202 (1960)
102. Neidle, A., Van den Berg, C.J., and Grynbaum, A.J. Neurochem.
16, 225 (1969)
103. Ogston, A.G. Trans. Faraday Soc. 54, 1754 (1958)
104. Olson, J.A., and Anfinsen, K.B. JBC. 197, 67 (1952)
105. Olson, J.A., and Anfinsen, K.B. JBC. 202, 841 (1953)
106. Pilz, I., and Sund, H. Eur. J. Biochem. 20, 561 (1971)
107. Piszkievicz, D., and Smith, E.L. Biochem. 10, 4544 (1970)
108. Piszkievicz, D., Landon, M., and Smith, E.L. JBC. 245, 2622 (1970)
109. Piszkievicz, D., Landon, M., and Smith, E.L. JBC. 246, 1324 (1971)
110. Reissler, E., Pouyet, J., and Eisenberg, H. Biochem. 9, 3095 (1970)
111. Reynolds, J. and Tanford, C. JBC. 245, 5161 (1970)
112. Roberts, B.B. JMB. 45, 22, (1969)
113. Rogers, K.S., Geiger, P.J., Thompson, T.E., and Hellerman, L.
JBC. 238, PC481 (1963)
114. Sanner, T. BBA. 250, 297 (1971)
115. Sanwal, B.D. Arch. Biochem. Biophys. 93, 377 (1961)
116. Schneider, W.C. JBC. 176, 259 (1948)
117. Schoffeniels, E. Arch. Int. Physiol. Biochim. 74, 665 (1966)
118. Schoffeniels, E. Arch. Int. Physiol. Biochim. 74, 333 (1966)
119. Sedgwick, K.A., and Frieden, C. BBRC. 32, 392 (1968)
120. Shafer, J.A., Chiancone, E., Yielding, K.L., and Antonini, E.
Eur. J. Biochem. 28, 528 (1972)
121. Shapiro, A.L., Vinuella, E., and Maizel, J.V. BBRC. 28, 815 (1967)
122. Smith, E.L., Landon, M., Piszkievicz, D., Brattin, W.J., Langley, T.J.,
and Melamed, M.D. PNAS. 67, 724 (1970)
123. Snoke, J. JBC. 223, 271 (1956)
124. Stachow, C.S., and Sanwal, B.D. BBA. 139, 294 (1967)
125. Stahl, W.L., Smith, J.C., Napolitano, L.M., and Basford, R.E.
J. Cell. Biol. 19, 293 (1963)

126. Stevenson, R.M., and Lejohn, H.B. JBC. 246, 2127 (1971)
127. Strickland, W.N., Jacobson, J.W., and Strickland, M. BBA. 251,
21 (1971)
128. Struck, J. Jr., and Sizer, I.W. Arch. Biochem. Biophys. 86, 260 (1960)
129. Sund, H., and Burchard, W. Eur. J. Biochem. 6, 202 (1968)
130. Sund, H., Pilz, I., and Herbst, M. Eur. J. Biochem. 7, 517 (1969)
131. Sungman Cha. JBC. 243, 820 (1968)
132. Szecepaniak, A.C., Cottrell, C.A. Nature. 241, 62 (1973)
133. Tomkins, G., Yielding, K.L., Talal, N., and Curran, J.F.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 461 (1963)
134. Valentine, R.C. Nature. 184, 1838 (1959)
135. Valentine, R.C., and Stadtman, E.R. Biochem. 7, 2143 (1968)
136. Veronese, F.M., Piszkievicz, D., and Smith, E.L. JBC. 247, 754 (1972)
137. Vitorelli, L., Chiancone, E., Yielding, K.L., and Antonini, E.
BBRC. 41, 1469 (1970)
138. Weber, K., and Osborn, M. JBC. 244, 4407 (1969)
139. Wilkinson, G.N. Biochem. J. 80, 324 (1961)
140. Wootton, J.C., Chambers, G.K., Taylor, J.G., and Fincham, J.R.S.
Nature. 241, 42 (1973)

